

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-500020

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)1月6日

(51) Int.Cl.⁴
C 1 2 N 9/12
1/21
15/54
/ (C 1 2 N 9/12
C 1 2 R 1:01)

識別記号 ZNA
庁内整理番号 9359-4B
7236-4B
FI

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-514681
(86) (22) 出願日 平成3年(1991)8月13日
(85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)2月12日
(86) 国際出願番号 PCT/US91/05753
(87) 国際公開番号 WO92/03556
(87) 国際公開日 平成4年(1992)3月5日
(31) 優先権主張番号 567, 244
(32) 優先日 1990年8月13日
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, NL, S E), AU, CA, JP, US

(71) 出願人 エフ. ホフマンーラ ロシュ アクチェン
ゲゼルシャフト
スイス国, ツューハー—4002 パーゼル,
グレンザッヘルシュトラッセ 124
(72) 発明者 ゲルフアンド, デビッド エイチ.
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94611,
オークランド, チェルトン ドライブ
6208
(72) 発明者 ローヤー, フランシス シー.
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94611,
オークランド, サロニ ドライブ 6641
(74) 代理人 弁理士 宇井 正一 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サーモタガ・マリチマから精製された熱安定性核酸ポリメラーゼ酵素

(57) 【要約】

精製された熱安定性酵素がユーバクテリウムであるサーモタガ・マリチマ (*Thermotaga maritima*) に由来する。この酵素は、ゲル電気泳動により測定された分子量約97キログルトン及びDNAポリメラーゼI活性を有する。この酵素は天然の又は組換え宿主細胞から製造することができ、そしてプライマー及びヌクレオシドトリホスフェートと共に温度サイクル連鎖反応において使用することができ、この反応においては少なくとも1つの核酸配列が既存の配列から大量に増幅される。

請求の範囲

1. ユーバクテリウムのサーモタガ・マリチマ (*Thermotoga caritima*) に由来し、ヌクレオシド三リン酸の結合による、核内筋環口に対して相補的である核筋環の形成を促進する、複製された塩安定性 DNAポリメラーゼ【請求項1】。
2. 約97キログルトン〜103キログルトンの分子量を有する、請求項1に記述の酵素。
3. 逆転写酵素活性を有する、請求項1に記述の酵素。
4. 3'→5' エキソヌクレアーゼ活性を有する、請求項1に記述の酵素。
5. 自然の形態である、請求項1に記述の酵素。
6. 自然の形態である、請求項2に記述の酵素。
7. 組み換え体の形態である、請求項1に記述の酵素。
8. 組み換え体の形態である、請求項2に記述の酵素。
9. 逆転写酵素活性および3'→5' エキソヌクレアーゼ活性を有する、請求項2に記述の酵素。
10. 自然の形態である、請求項9に記述の酵素。
11. 組み換え体の形態である、請求項9に記述の酵素。
12. 工程：
 - (a) サーモタガ・マリチマ (*Thermotoga caritima*) の細胞から粗抽出物を回収し、
 - (b) サーモタガ・マリチマ (*Thermotoga caritima*) の DNAポリメラーゼが前記抽出物中のすべての核筋から解離するように、前記抽出物のイオン強度を調整し、
 - (c) 前記抽出物を疎水性相互作用クロマトグラフィーにかけ、
 - (d) 前記抽出物を DNA結合性タンパク質アフィニティークロマトグラフィーにかけ、

トグラフィーにかけ、

(e) 前記抽出物をヌクレオチド結合性タンパク質のアフィニティークロマトグラフィーにかけ、そして

(f) 前記抽出物をアニオン交換クロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィーおよびヒドロキシパタイトクロマトグラフィーから選択されるクロマトグラフィーにかけ、ことを含んでなる、サーモタガ・マリチマ (*Thermotoga caritima*) の細胞からサーモタガ・マリチマ (*Thermotoga caritima*) DNAポリメラーゼを精製する方法。

13. サーモタガ・マリチマ (*Thermotoga caritima*) DNAポリメラーゼ【活性をコードする組み換え DNA配列】。

14. アミノ酸塩からカルボキシ基への配列番号：1のアミノ酸配列：

```

1  HARLPLPDGT ALAYRAYVAL DRSLSTSTGI PTNATYGVAR BLVRPIKDH
51  IVCKDYVAVA PDKKAATPRH KLEETPKQR PKTPDLLIQ LPYINKLVEA
101 LGHKVLEVEG YEADIIATL AVHGLPLPDE IFIVTGKDH LQVNEKIKV
151 WRIVKGISDL ELYDAQVKE KYGVPPQIP DLLALTGDEI DNIPGVTCIG
201 EKTAVQLLEK YKDLIEDLNH YRELQKVRK ALLRDBENAI LSKKLAILET
251 NVPIDINQDE LRYQCYDREK LPLLEKLEP ASINXELQVY ESEPPYGYRI
301 VKDLVEPERL IEKLRSPSPF AIDLETSSLD PDCDVGIS VSPFKPEAYY
351 IPLHHRNAQN LDEKVELKKL KEILBPPCAK IVGNLKPDI KYLHVKGVEP
401 VPPYFDTHIA AYLLPNEKK PNLDDLAKP LGVNTSYQE LHSPPPLPG
451 PSPADVPYK AANYSCEAD ITYRLYKTL LKLEADLEN VPYKIEHPLV
501 NYLARHNLNG VYVDEPLKK LSEYKCKLE ELABBIYRIA CEPNINSPK
551 QVSRILPEKL GIKPRGRKRK TGDYSTIRBV LEELAGEHPI IPLILEYRKI
601 QKLKSTYIDA LPHVNPHTG RIHASPNTG TATGRSSSD PNLQNLPTKS
651 EEGKEIRKAI VPQDPNHWIV SADYSQIELR ILAHLSDGEN LLRAFEEDID

```

```

701 VHTLTASRIP NVKPEEYTEE HRRACKHYNF SIIYCVTPYG LSVRLGVPVK
751 EAENHIVNYP VLYPKVRDYI QRYVSEAKK GYVRLPGRK RDIPQLNARD
801 RNTQAEGERI AINTPIQGTA ADIKLALIE IBRELKERKH RSKMIIQVHD
851 ELVPEVPNEB KDALVELVRD RMTNVVKLSV PLEVDTICK TWS

```

をコードする、請求項13に記述の DNA配列。

15. 配列番号：1の DNA配列：

```

1  ATGCGGAGAC TATTTCTCIT TGATGGAAC TCTCTGCCCT ACAGACCGTA
51  CTATGCACTC GATAGATCGG TTTCTACTTC CACCGGCATT CCCACAAAGC
101 CCACATACGG TGTGGCGAGG ATGCTGCTGA GATTATCAA AGACCATATC
151 ATTCTCGGAA AAGACTACGT TCTCTGCGCT TTGCACAAA AAGCTGCCAC
201 CTTGAGACAC AAGCTCCTCG AGACTTACAA GGCTCAAGA CCAAAGACTC
251 CGGATCTCCT GATTACGAGC CTTCGGTACA TAAAGAAGCT GGTGGAAGCC
301 CTTGCAATGA AAGTGTGGA GGTAGAAGA TACGAAGCG ACCATATAAT
351 TGCCACTCTG GCTGTGAAGG GGCTTCCGCT TTTGATGAA ATATTCATAG
401 TGACCGGAGA TAAAGACATC CTTGAGCTTG TCAACGAAA CATCAAGGTC
451 TGGCGAATCG TAAAGGGAT ATCCGATCTG GAACCTTACG ATGCGCAGAA
501 GGTGAAGGAA AATACCGGT TTGAACCCCA GCAGATCCCG GATCTTCTGG
551 CTCTAACCGG AGATGAAATA GACAACATCC CCGGTGTAC TGGGATAGGT
601 GAAAAGACTG CTGTTACGCT TCTAGAGAAG TACAAAGACC TCGAAGACAT
651 ACTGAATCAT GTTCGCGAAC TTCTCAAAA GGTGACAAA GCCCTGCTTC
701 GAGACAGAGA AAACGCCATT CTCAGCAAAA AGCTGGCGAT ICTGGAAGCA
751 AACGTTCCCA TTGAAATAAA CTGGGAAGAA CTTCCCTACC AGGCTACGA
801 CAGACAGAAA CTCCTACCAC TTTGAAAGA ACTGGAATTC GCATCCATCA
851 TGAAGCAACT TCAACTGTAT GAAGAGTCCG AACCGTTGG ATACAGAAAT
901 GTGAAAGACC TACTGCAATT TGAAAAACTC ATACAGAAAC TGAGAGAATC
951 CCTTCTGTTT GCCATAGATC TTGAGACGTC TTCCCTCGAT CCTTTCGACT
1001 GGCACATTGT CGGTATCTCT GTGCTTTTCA AACCAAGGA AGCGTACTAC

```

```

1051 ATACCACTCC ATCATAGAAA CGCCAGAAC CTGACGAAA AAGAGCTTCT
1101 GAAAAAGCTC AAAGAAATTC TGGAGGACCC CGGAGCAAG ATCGTTGGTC
1151 AGAATTTGAA ATTGCGATTAC AAGGTGTTGA TGCTGAAGGG TGTGAACCTT
1201 GTTCTCTCCTT ACTTCGACAC GATGATAGCG GCTTACCTTC TTGAGCCGAA
1251 CGAAAAGAAAG TCAATCTCGG AGCATCTCGC ATTGAAATTT CTTGATACA
1301 AAATGACATC TTACCAAGAG CTCATGCTCT TCTCTTTTCC GCTGTTTGGT
1351 TTCAGTTTTC CCGATGTTCC TGATAGAAAA GCAGCGAACT ACTCTGTGTA
1401 AGATGCAGAC ATCAGCTACA GACTTTACAA GACCTGAGC TTAAGACTCC
1451 ACGAGGCGAG TCTGCAAAAC GTGTTCTACA AGATAGAAAT GCCCTTGTG
1501 AACGTGCTTG CACGGATGGA ACTGAACGGT GTGTATGTGG ACACAGAGTT
1551 CCTGAAGAAA CTCTCAGAG AGTACGGAAA AAAACTCGAA GAAGTGGCAG
1601 AGGAAATATA CAGGATAGCT GGAGAGCCGT TCAACATAAA CTCACCGAAG
1651 CAGGTTTCAA GGATCCTTTT TGAAGAACTC GGCATAAAAC CAGCTGCTAA
1701 AACGACGAAA ACGGGAGACT ATTCAACAGC CATAGAAGTC CTCGAGGAAC
1751 TTGCGGTGTA ACACGAAATC ATTCCTCTGA TTCTTGAATA CAGAAAGATA
1801 CAGAAATTGA AATCAACCTA CATAGAGCTT CTTCGCAAGA TGCTCAACCC
1851 AAAGACCGGA AGGATTCATG CTCTTTTCAA TCAAGCGGG ACTGCCACTG
1901 GAAGACTTAG CAGCAGCGAT CCAATCTTC AGAACCTCCC GACGAAAGT
1951 GAAGAGGGAA AAGAAATCAG GAAAGCGATA GTTCTCTAGG ATCCAAACTG
2001 GTGGATCTCT AGTGGCGACT ACTCCCAAT AGAAGTGAAG ATCCTGCGCC
2051 ATCTCAGTGG TGATGAGAA CTCTTGAAGG CATTGGAAGA GGGCATCGAC
2101 GTCCACACTC TAACAGCTTC CAGAAATTC AACCTGAAAC CCGAAGAACT
2151 AACCGAAGAA ATCGCGCGGG CTGTTAAAT GTTAAATTT TCCATCATAT
2201 ACGGTGTAAC ACCTTACGGT CTGCTGTGTA GCTTGGAGT ACCTGTGAAA
2251 GAAGCAGAAA AGATGATCGT CAACTACTTC GTCTCTTACC CAAAGGTGGC
2301 CGATTACATT CAGAGGCTCG TATCGGAAGC CAAAGAAAAA GCTATGTGTA
2351 GAACGCTGTT TGAAGAAAA AGAGACATAC CACAGCTCAT GCGCCGGGAC

```

2401 AGGAACACAC AGGCTGAAGG AGAACCAATT GCCATAACA CTCGCCATACA
2451 GGGTACAGCA GCGGATATAA TAAAGCTGGC TATGATAGAA ATAGACAGCG
2501 AACTGAAAGA AAGAAAAATG AGATCGAAGA TGATCATACA GGTCCACGAC
2551 GAACTGGTTT TTGAAGTGGC CAATGAGGAA AAGGACGCGC TCGTCGAGCT
2601 GGTGAAAGAC AGAATGACGA ATCTGCTAAA GCTTTCAGTG CCGCTCGAAG
2651 TGGATGTAAC CATCGGCAAA ACATGGTCGT GA

である。請求項14に記載の DNA配列。

16. 請求項13に記載の DNA配列を含んでなる組み換え DNAベクター。

17. 請求項16に記載のベクターで形質転換された組み換え宿主細胞。

18. 大腸菌 (*E. coli*) である。請求項17に記載の組み換え宿主細胞。

19. 約86キログルトンの分子量を有し、組み換え体の形態である。請求項1に記載の酵素。

20. 約70キログルトンの分子量を有し、組み換え体の形態である。請求項1に記載の酵素。

21. 配列番号: 1 のアミノ酸番号 140~ 893をコードする。請求項13に記載の DNA配列。

22. 配列番号: 1 のヌクレオチド番号 418~2682である。請求項21に記載の DNA配列。

23. 配列番号: 1 のアミノ酸番号 284~ 893をコードする。DNA配列。

24. 配列番号: 1 のヌクレオチド番号 850~2682である。請求項23に記載の DNA配列。

およびKorberg, 1996, *J. Biol. Chem.*, 271:5419-5427を参照のこと。好熱性細菌、例えば、サーモタガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) からの DNAポリメラーゼの単離および精製についてなされている研究は非常に少ない。サームス・アクアチクス (*Thermus aquaticus*) YT-1菌株の細胞からの DNAポリメラーゼ活性についての6工程の単離および精製が、Kaledinら, 1987, *Biochemistry*, 45:844-851に開示されている。これらの工程は、粗製の抽出物の単離、DEAE-セルロースのクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトによる分別、DEAE-セルロースによる分別、および一本鎖 DNA-セルロースのクロマトグラフィーを包含する。精製された酵素の分子量は、Kaledinらにより62,000ダルトン/モノマー単位として報告された。

サームス・アクアチクス (*Thermus aquaticus*) からのポリメラーゼの第2の精製のスキームは、Chienら, 1976, *J. Bacteriol.*, 127:1550-1557に記載されている。この方法においては、粗製の抽出物をDEAE-セファデックス (Sephadex) カラムに適用する。次いで、ブールした分画を透析し、そしてウシ血清アルブミン (BSA) を添加してポリメラーゼ活性の損失を防止する。生ずる混合物を DNA-セルロースカラムに負荷する。カラムからブールした物質を透析する。精製されたタンパク質の分子量は約63,000~68,000であると報告されている。

熱安定性酵素、例えば、Chienらおよび Kaledinらにより記載されている酵素を使用して、残存する核酸配列を最初に存在する量と比較して大量に増幅することは、米国特許第 4,683,195号; 米国特許第 4,683,202号および米国特許第 4,985,188号に記載されており、これらは PCR法を記載しており、それら開示の各々を引用によってここに加える。プライマー、鋳型、ヌクレオチド三リン酸、適当な

サーモタガ・マリチマから精製された熱安定性核酸ポリメラーゼ酵素

技術分野

本発明は、超好熱性ユーバクテリア (eu bacteria) サーモタガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) から精製された、熱安定性 DNAポリメラーゼおよび前記酵素を単離および生産する手段に関する。熱安定性 DNAポリメラーゼは、多数の組換え DNA技術、ことにポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による核酸の増幅において有用である。

背景の技術

バクテリアであるサーモタガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) の分離は Huberら, 1986, *Arch. Microbiol.*, 144:324-333に記載されている。サーモタガ・マリチマ (*T. maritima*) は、個性嫌気性、桿形、発酵性、超好熱性であり、そして55℃~90℃において増殖し、最適な増殖温度は約80℃である。このユーバクテリウムは、イタリ-およびアゾレスにおける地熱で加熱された海産物から単離された。サーモタガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) 細胞は精微構造および羊毛の鞭毛を有する。サーモタガ・マリチマ (*T. maritima*) はムレインおよび脂肪酸含有脂質、ジフテリア毒素感受性延長因子2、RNAポリメラーゼサブユニットのパターン、および抗生物質に対する感受性によりユーバクテリア界に分類される。

広範な研究が中温性微生物、例えば、大腸菌 (*E. coli*) からの DNAポリメラーゼの単離について実施されてきている。例えば、Bessmanら, 1957, *J. Biol. Chem.*, 223:171-177、およびButtinお

核酸増幅および反応条件、およびポリメラーゼを PCR法において使用し、この方法は簡便な DNAの定性、プライマーのハイブリダイゼーション、および相補的鎖の合成を包含する。各プライマーの伸長生成物は、所望の核酸配列の生成のための鋳型となる。これらの特許が開示するように、使用するポリメラーゼが熱安定性酵素である場合、ポリメラーゼは各反応工程後に添加することは必要ではない。なぜなら、熱はポリメラーゼ活性を破壊しないからである。

米国特許第 4,689,818号、欧州特許公開第 259,017号、および PCT公開第 83/06691号 (それらの開示をここに引用によって加える) は、サームス・アクアチクス (*Thermus aquaticus*) からの約84 kDa の熱安定性 DNAポリメラーゼの単離および組み換え発現および PCRにおけるそのポリメラーゼの使用を記載している。サームス・アクアチクス (*T. aquaticus*) の DNAポリメラーゼは PCRおよび他の組換え DNA技術における使用のためにことに好ましいが、他の熱安定性ポリメラーゼが要求されている。

したがって、前述の PCR法を改良し、そして他の組換え技術、例えば、DNAの配列決定、ニック開裂、およびなお逆転写において熱安定性 DNAポリメラーゼを使用するとき、得られる結果を改良するために使用することができる、精製された、熱安定性 DNAポリメラーゼを生産することはこの分野において望まれている。本発明は、サーモタガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) の DNAポリメラーゼのための組み換え発現ベクターおよび精製のプロトコルを提供することによって、その要求を満たすことを促進する。

発明の開示

本発明は、ヌクレオチド三リン酸の組合による、核酸鋳型鎖に対して相補的である核酸鎖の形成を触媒する、精製された熱安定性

DNAポリメラーゼI酵素を提供する。固定された酵素はサーモタガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) (Tma) からの DNAポリメラーゼIであり、そして SDS-PAGEにより固定して約97キロダルトン (kDa) の分子重および、102kDaの、Tma DNAポリメラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列から推定される分子重がある。この固定された物質はPCRにおいて使用して、最初に存在する量と比較して大きい量の所定の核酸配列を生産することができるので、これらの配列を容易に検出および/または分析することができる。

サーモタガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) からの Tma DNAポリメラーゼ酵素をコードする遺伝子も同定され、クローニングされ、配列決定され、そして高いレベルで発現され、そしてなお本発明の総安定性酵素を固定するための他の手段を提供する。完全な遺伝子および Tma酵素のためのコード配列に加えて、Tma DNAポリメラーゼのためのコード配列の断片体もまた提供される。

本発明はまた、1個または2個以上の非イオン性ポリマーの洗剤を含有する緩衝液中の前述の精製された総安定性 Tma酵素を含んだ安定な酵素組成物を包含する。

最後に、本発明は本発明の総安定性ポリメラーゼを精製する方法を提供する。この方法は、サーモタガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) の細胞から抽出物を回収し、DNAポリメラーゼが抽出物中のすべての核酸から評価するように、抽出物のイオン強度を調節し、該抽出物を親水性相互作用クロマトグラフィーにかけ、該抽出物をDNA結合性タンパク質アフィニティークロマトグラフィーにかけ、該抽出物をアニオン交換クロマトグラフィーまたはカチオン交換クロマトグラフィーまたはヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーにかけ、好ましい洗剤組成物において、これらの工程は順次に前述の順序で実施される。ヌクレオチド結合性

タンパク質アフィニティークロマトグラフィーの工程は、DNAポリメラーゼをエンドヌクレアーゼのタンパク質から分離するために好ましい。

発明を実施するための形態

本発明は、Tma DNAポリメラーゼをコードする DNA配列および発現ベクター、Tma DNAポリメラーゼの精製のプロトコル、精製された Tma DNAポリメラーゼの固定、および Tma DNAポリメラーゼを使用する方法を提供する。本発明の理解を促進するために、多量の用語を下に定義する。

用語「細胞」または「細胞系」は互換的に使用し、そしてすべてのこのような表示は子孫を包含する。こうして、図「形質転換体」または「形質転換された細胞」は、伝移の後に細胞内に、一次形質転換細胞、およびその細胞から誘導された細胞物を包含する。すべての子孫は、集団的または偶然の突然変異のために、DNA含有が正統に同一でないことがある。もとの形質転換された細胞についてスクリーニングしたとき同一の機能をもつ突然変異子孫は、形質転換体の定義の中に含まれる。

用語「コントロール」は、特定の宿主生物体における作用可能な変換したコード配列の発現に必要な DNA配列を呼ぶ。例えば、原核生物に適合なコントロール配列はプロモーター、必要に応じて、オペレーター配列、リボソーム結合部位、および可能な場合は他の配列、例えば、転写停止配列を包含する。

用語「発現系」は、所望のコード配列およびコントロール配列を作用可能な変換で含有する DNA配列を呼び、こうしてこれらの配列で形質転換された宿主はコードされたタンパク質を生産することができる。形質転換を実施するために、発現系をベクター上に含める

ことができる：関係する DNAはまた、宿主の染色体の中に組み込むことができる。

用語「遺伝子」は、回収可能な生物活性ポリペプチドまたは前駆体の発現をコードする DNA配列を呼ぶ。こうして、Tma DNAポリメラーゼ遺伝子はポリメラーゼおよび Tma DNAポリメラーゼのコード配列を含む。ポリペプチドは、全長のコード配列によるか、あるいは所望の酵素活性が保持されるかぎりコード配列の一部によりコードされることができる。

用語「作用可能に変換した」は、コントロール配列がコードされたタンパク質の発現を促進するために機能するように、コード配列の位置を決定することに関する。こうして、コントロール配列に「作用可能に変換した」コード配列は、コード配列がコントロール配列の命令下で発現されることができるようなコンフィギュレーションに関する。

用語「混合物」は、それが Tmaポリメラーゼを含有する混合物に関係するとき、Tmaポリメラーゼを含むが、さらに他のタンパク質を含むことができる、物質の集まりを呼ぶ。Tmaポリメラーゼが組織換え宿主細胞に由来する場合、他のタンパク質は通常宿主細胞に関連するであろう。宿主が細菌である場合、汚染するタンパク質は細菌のタンパク質であろう。

用語「非イオン性ポリマー洗剤」は、イオンの電荷をもせず、そして、本発明の目的のために、約 3.5〜約 8.5のpH範囲で Tma酵素を可溶化する能力により特徴づけられる表面活性剤を意味する。適当な非イオン性ポリマー洗剤の多数の例は、米国特許局特許出願第 387,003号、1989年7月28日提出（その開示をここに引用によって加える）に記載されている。

用語「オリゴヌクレオチド」は、ここで使用するとき、2または

それより多く、好ましくは3またはそれより多くの、通常10より多いデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドから形成された分子として定義される。正確な大きさは多数の因子に依存し、次いでこれらの因子はオリゴヌクレオチドの究極の機能またはその使用に依存する。オリゴヌクレオチドは合成的にまたはクローニングにより誘導することができる。

用語「プライマー」は、ここで使用するとき、プライマーの発現が開始される条件下に配位されたとき、合成の開始点として作用することができるオリゴヌクレオチドを呼ぶ。オリゴヌクレオチドの「プライマー」は、前記された制限消化物におけるように、天然に存在することができるか、あるいは合成的に生成することができる。制限消化物に対して恒定的であるプライマーの発現生成物の合成は、4つの異なるヌクレオチド三リン酸および Tma総安定性酵素の存在下に適当な緩衝液の中で適当な量において開始される。「緩衝液」は、所望のpHに調節された、コファクター（例えば、2価の金属イオン）および塩（適当なイオン強度を与えるために）を含む。Tmaポリメラーゼについて、緩衝液は好ましくは1〜3mMのマグネシウム塩、好ましくは HgCl₂、50〜200μMの各ヌクレオチド三リン酸、および 0.2〜1μMの各プライマー、ならびに50mMの KCl、10mMのトリス緩衝液 (pH 8.0〜8.4)、および 100μg/mlのゼラチン（しかしゼラチンは要求されず、そしてある応用において、例えば、DNAの配列決定において回避すべきである）を含有する。

プライマーは均質における効率を最大とするためには一本鎖であるが、二本鎖であることができる。二本鎖である場合、プライマーをまず処理してその鎖を分離した後、発現生成物の配位のために使用する。プライマーは通常オリゴデオキシリボヌクレオチドである。プライマーは、ポリメラーゼ酵素の存在下に伸長生成物の合成をプ

ライミングするために十分に長くなくてはならない。プライマーの正副な長さは多量の因子、例えば、プライマーおよび所望の塩基に依存し、そして反応は反応後のプライマーの適切なアニーリングを促進するためのプライマーの長さに依存して開始しなくてはならない。この配列の短縮さに依存して、オリゴヌクレオチドプライマーは典型的には15~35ヌクレオチドを含有する。短いプライマー分子は、一般に、十分に安定な複合体を形成するために、より低い温度を必要とするであろう。

プライマーは、特定の配列の順に対して「実質的に」相補的であるように選択すべきである。プライマーは、十分に相補的であって、プライマーの延長が起こるように所望の順とハイブリダイゼーションしなくてはならない。プライマーの配列は、所望の正副な配列を反映することは必要ではない。例えば、非相補的ヌクレオチドの断片は、プライマーの5'末端に結合することができ、プライマーの配列の残部はその順に対して実質的に相補的である。非相補的塩基またはより長い配列をプライマーの中に介在させることができるが、ただしプライマーは所望の配列と十分に相補的であって、ハイブリダイゼーションし、これによりプライマーの伸長生成物の形成のための所望/プライマー複合体を形成することを条件とする。

用語「制限エンドヌクレアーゼ」および「制限酵素」は、二本鎖DNAを特定のヌクレオチド配列でまたはその付近で切断する制限酵素を呼ぶ。

用語「熱安定性酵素」は、加熱に対して安定でありかつ耐熱性であり、そしてヌクレオチドの結合を適切な方法で促進（促進）して、鎖延伸に対して相補的である伸長生成物を形成する酵素を意味する。一般に、プライマー伸長生成物の合成は、プライマーの3'末端において開始し、そして合成が停止するまで所望の配列の5'末端に

向かって進行する。熱安定性酵素は、80℃~105℃の温度に短時間（すなわち、5~30秒）反応した後、復元しかつ活性を再び回復しなくてはならず、そして80℃以上の至適温度をもたなくてはならない。

本発明のTaaの熱安定性DNAポリメラーゼ酵素は、ポリメラーゼ連鎖反応またはPCRとして知られている均一反応における有効な応用のための条件を満足する。Taa DNAポリメラーゼ酵素は、PCR法において主要な工程である、二本鎖の複製の促進を要するために必要な時間の間、高温に暴露したとき、不可逆的に活性（不活性化）しない。ここにおける目的のため、酵素の不可逆的な活性は、酵素の活性の永久的かつ完全な損失を意味する。

複製の促進を実施するために必要な反応条件は、例えば、緩衝液の塩濃度および組成、酸性される核酸の長さおよび口に依存するが、典型的には酸性反応は10秒~数分間で約80℃~約105℃である。緩衝液の塩濃度および/または核酸のGC組成が均加するにつれて、より高い温度を必要とすることがある。Taa酵素は約80℃~105℃の温度に比較的短い口で不可逆的に活性しない。

Taaの熱安定性酵素は、約80℃より高い、それが関係する至適温度を有する。80℃より低い温度はプライマーの所望へのハイブリダイゼーションを促進するが、塩の組成および口およびプライマーの組成および長さに依存して、所望へのハイブリダイゼーションはより高い温度（例えば、60℃~80℃）において起こることができ、これはプライマー延長反応の特異性を促進することができる。酵素のための至適温度が高くなればなるほど、プライマー結合の伸長反応の特異性および/または選択性はより大きくなるであろう。Taa酵素は約45℃~90℃の広い温度範囲にわたって活性を示す；好ましい至適温度は75℃~80℃である。

本発明はまた、サーモタガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) の熱安定性 DNAポリメラーゼI 活性をコードする DNA配列を提供する。この配列によりコードされるアミノ酸配列は、サームス・アクアチクス (*Thermus aquaticus*) およびサームス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) の熱安定性 DNAポリメラーゼの部分に対する相同性有する。Taa DNAポリメラーゼ遺伝子の5' -ATG 開始コドンからTGA -3' 停止コドンへの完全なコード配列は下に記載されており、そして配列を列挙する節において配列番号: 1として列挙されている。この配列に参照のために番号を付してある。

```

1  ATGGCGACAC TATTCTCTT TGATGGAAT GCTGTGGCT ACAGAGCGTA
51  CTATGCGCTC GATAGATCG TTTCTACTT CACCGGCATT CCCACAAACG
101 CCACATACCG TGTCGGGAGG ATGCTGGTGA GATTCATCAA AGCCATATC
151 ATTGTGGGAA AAGACTACGT TGCTGTGGCT TTGACAAAA AAGCTGCCAC
201 CTCAGACAC AAGCTCTCTC AGACTTACAA GGCTCAAGA CCAAGAGCTC
251 CGGATCTCTT GATTGAGAG CTTCCGTACA TAAAGAACT GGTGGAAGCC
301 CTGGAATGA AAGTGTGGA GGTAGAAGCA TACGAAGCGG ACGATATAAT
351 TGCCACTCTG GCTGTGAAGG GCTTCCGCT TTTTGATGAA ATATTCATAG
401 TGACCGGAGA TAAAGACATG CTTGAGCTTG TGAACGAAAA GATCAAGGTG
451 TGGCGAATCG TAAAGGGGAT ATCCGATCTG GAACTTTACG ATGCGCAGAA
501 GGTGAAGGAA AATACGGGTG TTCAACCCCA GCAGATCCCG GATCTTCTGG
551 CTCTAACCGG AGATGAATAA GACAACATCC CCGGTGTAAT TGGGATAGGT
601 GAAAGACTCG CTGTTGAGCT TGTAGAGAAG TACAAGACCC TCGAAGACAT
651 ACTGAATCAT GTTGGCGAAG TTCTCAAAA GGTGAGAAAA GCTGCTGCTC
701 GAGACAGAGA AAACGCCATT CTCAGCAAAA AGCTGGCGAT TGTGGAACAA
751 AACGTTCCCA TTGAATAAAA CTGGGAAGAA CTTGCTTACC AGGCTACGAA
801 CAGAGAGAAA CTCTTACCAC TTTTGAAGA ACTGGAATTC GCATCCATCA
851 TGAAGCAACT TCAACTGTAC GAAGAGTCCG AACCCGTTGG ATACAGAATA

```

```

901  GTCAAGACCC TAGTGGAAAT TGAAGAACTC ATAGAGAAAC TCAGAGAATC
951  CCGTTCGTTT GCCATAGATC TTGAGAGCTC TTCCCTCGAT CCTTTCGACT
1001 GCGACATTGT CGGTATCTCT GTCTTTTCCA AACCAAGGGA AGCGTACTAC
1051 ATACCACTCC ATCATAGAAA CCGCCAGAAC CTGGACGAAA AAGAGGTTCT
1101 GAAAAAGCTC AAAGAAATTC TGGAGGACCC CGGACGAAAC ATCGTTCGTC
1151 AGAATTTCGA ATTCGATTAC AACGTGTTGA TGGTGAAGGG TGTGAACTCT
1201 GTTCTCTCTT ACTTCGACAC GATGATAGCG GCATTACCTC TTGAGCGGAA
1251 CGAAAAAGAG TTCAATCTGG ACGATCTCCG ATTGAATTTT CTGGATACA
1301 AATGACATC TTACCAAGAG CTCATGCTCT TCTCTTTTCC GCTGTTTGGT
1351 TTCAGTTTTG CCGATGTTCC TGTAGAAAAA CGAGCGAACT ACTCCTGTGA
1401 AGATGACAGC ATCACTTACA GACTTTACAA GACCTGTAGC TTAAGACTCC
1451 ACCAGGCGAG TGTGGAAGAC GTGTTCTACA AGATAGAAAT GCCCTTGTG
1501 AACGTGCTTG CACGGATGGA ACTGAACGGT GTGATGTGCG ACACAGAGTT
1551 CCTGAAGAAA CTCTCAGAAG AGTACGGAAG AAACCTGCAA GAACTGECAG
1601 AGGAATATA CAGGATAGCT GGAAGACCGT TCAACATAAA CTCACCGAAG
1651 CAGGTTTCAA GATCTCTTTT TGAAGAACTC GGCATAAAAA CAGCTGTAAA
1701 AACGACGAAA ACGGGAGACT ATTCAACAGC CATAGAAATG CTCGAGGAAC
1751 TTGCGCGTGA ACACGAAATC ATTCCTCTGA TTCTTGAATA CAGAAAGATA
1801 CAGAAATGGA AATCAACCTA CATAGACGCT CTTCGCAAGA TGGTCAACCC
1851 AAAGACCGGA AGGATTGATG CTCTTTTCAA TCAAGCGGGG ACTGCGACTG
1901 GAAGACTTAG CAGCAGCGAT CCCAATCTTC AGAAGCTCCC GACGAAAGT
1951 GAAGAGGGA AAGAAATCAG GAAACGATA GTTCTCAGG ATCCAACTG
2001 GTGATCTCTC ACTGCGGACT ACTCCCAAT AAGAACTGAG ATCCTCGCCC
2051 ATCTCAGTGG TGATGAGAA CTCTTGAGGG CATTGGAAGA GGGCATCGAC
2101 GTCCACACTC TAACAGCTTC CAGAATATTC AACGTGAAC CCGAAGAACT
2151 AACCGAAGAA ATGCGCCGCG CTGGTAAAT GTTAAATTTT TCCATCATAT
2201 ACGGTGTAAC ACCTTACGGT CTGCTGTGCA GCGTTGGAGT ACCTGTGAAA

```

2251 GAACCAAGAA ACATGATCGT CAACTACTTC GTCCTCTACC CAAAGCTGCC
 2301 CGATTACATT CAGAGGGTCC TATCGGAAGC GAAAGAAAAA GGCTATGTTA
 2351 GAACGCTGTT TGGAGAAAAA AGAGACATAC CACAGCTCAT GGCCCGGGAC
 2401 AGGAACACAC AGGCTGAAGC AGAAGCAATT GCCATAAACA CTCCTCATACA
 2451 GGGTACAGCA GCGGATATAA TAAAGCTGCC TATGATAGAA ATAGACAGGG
 2501 AACTGAAAGA AAGAAAAATG AGATCGAAGA TGATCATACA GGTCCACGAC
 2551 GAACTGCTTT TTGAAGTCCC CAATGAGGAA AAGGACGCGC TCCTCGAGCT
 2601 GGTGAAAGAC AGAATGACGA ATGTGGTAAA GCTTTCAGTG CCGCTCGAAG
 2651 TGGATGTAAC CATCGGCAAA ACATGCTCGT GA

Taa DNAポリメラーゼ遺伝子の完全なコード配列、およびコードされた3文字の暗号で表されるアミノ酸配列の両者は、配列番号1として配列表の頭に記述されている。便宜上、Taa DNAポリメラーゼ遺伝子配列によりコードされたアミノ酸配列をまた、1文字の暗号でアミノ末端からカルボキシ末端に、下記に示す。この配列に参照のための番号が付けられている。

1 MARLFLDGT ALAYRAYAL DRSLSTSTGI PTNATYGVAR HLVRPIKDH
 51 IYKDYVAYA FDKKAATPRH KLETTYKAQB PKTPDLLIQ LPYIKLVEA
 101 LGMKYLEVEG YEADDIIATL AVKGLPLPDE IFIVTCDKDM LQLYNEKIKV
 151 DRIVKGISDL ELYDAQVYRE KYGVEPQIP DLLALTGDEI DNIFGVGTIG
 201 EKTAVQLLEN KYLEDILNWH VRELPRQVRR ALLRDRENAI LSKLAILET
 251 NVPFIEINHEE LBYQGYDREK LLPLKLELEF ASIKELQLY ESEEPVGYRI
 301 VKDLVEPEKL IEKLRESPEF AIDLETSSLD PFDCCIVGIS VSPKPKBAYY
 351 IPLHNRNAQN LDKNEVLKKL KEILEDPCAK IVGNLKFDPY KVLNVKGVPE
 401 VPPYFDTHIA AYLLPEPNEK PNLDDLALRP LGYKNTSYQE LHSFSPFLFG
 451 FSPADVPVEK AANYSCEDAD ITYRLYKTLK LKLEADLEN VPKRIEHPVY
 501 NVLARMELNG VYDTEPLNK LSEYCKKLE ELABELYRIA GEPNNINSPK
 551 QVSRILPERL GIKPRCKTK TGOYSTRIEV LELAGEHEI IPLILEYRKI

からの DNAポリメラーゼ I のタンパク質のアミノ酸配列を比較することによって開発された。次いで、これらの保存された領域に相当するプライマーが設計された。本発明の Taa 配列を使用して他の増殖プライマーを設計することができる。増殖プライマー法の一般的な適用性を、ここで、Taa 遺伝子のクローニングに適用された方法を特別に参照して例示する。

Taa DNAポリメラーゼ I 遺伝子をクローニングするために、保存されたアミノ酸配列をアミノ酸の各々のための可能なコドンすべてに転写した。遺伝コードの増殖性のために、所定のアミノ酸はいくつかの異なるコドンにより表示することができる。所定のアミノ酸のためのコドンの中に複製の塩基が存在できる場合、その配列は3塩基をもつと言われる。

次いで、所定のアミノ酸配列をコードすることができる、すべての可能な DNA配列のプールとして、プライマーを合成した。所定のプライマーのプールについての増殖の塩は、各位置における可能なヌクレオチドの数を掛けることによって決定することができる。

プライマーのプールがより増殖性をもつようになるほど（すなわち、プール内の個々のユニークプライマー DNA配列の数がより大きくなるほど）、ユニークプライマー配列の1つが所望のもの以外の偶然染色体 DNAの領域に結合する率はより大きくなりそれゆえ、生ずる増殖の特異性はより少なくなる。増殖プライマーを使用して増殖の特異性を増加するために、プールをサブセットとして合成し、こうしてサブセットの全体の数が所定のアミノ酸配列をコードするすべての可能な DNA配列を含むが、各々のサブセットは一部分のみを含むようにする。例えば、1つのプールはGまたはCを特定の位置に含有することができるが、他のものは同一位置にAまたはTを含有する。これらのサブプールの各々は16番号で表示される。

601 QKLKSTYIDA LPKHVNPKTG RIHASFQNTG TATGRLSSSD PNLQNLPTKS
 651 EEGKEIRHAI VPQDPNTWIV SADYSQIELR ILAHLGSDEN LLRAPEEGID
 701 VHTLTASRIP NVKPEEVTBE HRRACKHVNPF SIITGVTPYC LSVRLCVPYK
 751 EASRDIIVNYF VLYPKVRDYI QRVSSEAKK GYVRTLPGRK RDIPQLHARD
 801 RNTQAEGERI AINTPIQGTG ADIINKLHIE IDRELKERKH RSKHIIQVHD
 851 ELVPEVPNEE KDALVELVXD RHTNVVKLSV PLEVDTTIGK TWS

アミノ酸のための1文字の暗号を便宜上下に示す。

F = フェニルアラニン	H = ヒスチジン
L = ロイシン	Q = グルタミン
I = イソロイシン	N = アスパラギン
M = メチオニン	K = リジン
V = バリン	D = アスパラギン酸
S = セリン	E = グルタミン酸
P = プロリン	C = システイン
T = スレオニン	W = トリプトファン
A = アラニン	R = アルギニン
Y = チロシン	G = グリシン

Taa DNAポリメラーゼ I のためのコード配列は、「増殖 (degenerate) プライマー」法により固定され、この方法は広い適用性を有し、そして本発明の広範な面である。増殖プライマー法において、既知の塩安定性 DNAポリメラーゼの保存されたドメインに対応する任意の塩安定性ポリメラーゼのコード配列の DNA断片を固定することができる。

増殖プライマー法の1つの形態において、対応する保存されたドメインは、Taq, Taa および Tth の塩安定性 DNAポリメラーゼのアミノ酸配列のためのコード配列からのものである。増殖プライマー法は、Taq, Tth, T および他の保存された領域が固定された E. coli

前方プライマー（非コード領域に対して相対的である、遺伝子の5'-領域から3'-領域に向う方向）および逆プライマー（コード領域に対して相対的である、遺伝子の3'-領域から5'-領域に向う方向）の両者を、これらの保存された領域の大部分について設計して Taa ポリメラーゼをクローニングした。5'-末端に制限部位をもつプライマーを設計して、クローニングを促進した。前方プライマーは BglII 制限部位 (AGATCT) を含有したが、逆プライマーは EcoRI 制限部位 (GAATTC) を含有した。さらに、プライマーは5'-末端に2ヌクレオチドを含有して、その制限部位における切断効率を増加した。

次いで、増殖プライマーを PCR法において使用し、ここで典型的増殖はサーモタガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) からの染色体 DNAであった。1系列の塩成プロファイルと組み合わせ、前方プライマーおよび逆プライマーのプールの組み合わせを使用する PCR法の生成物を比較した。Taq 染色体 DNAを使用して発生させた生成物に対して特異的な同一の大きさの生成物を生成したとき、PCR断片をゲル精製し、同定し、そしてベクター-BSPH3H: BglII の中にクローニングした (ストラタジーン (Stratagene) のベクター-pBSPH+ の断片、ここで pBSPH+ の HindIII 部位は BglII 部位に転写されている)。配列がポリメラーゼタンパク質とくに Taq ポリメラーゼおよび Tth ポリメラーゼの中の他の既知のアミノ酸配列に対して相関性であるアミノ酸配列をコードすることが見出された場合、その配列は可能性ある塩安定性 DNAポリメラーゼコード配列として固定された。

次いで、Taa DNAポリメラーゼ断片の部分が、サザン・ブロット分析により、サーモタガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) の染色体 DNA中に固定された。Taa 染色体 DNAを配々の断片で消化し、そ

してニトロセルロースのフィルターに移した。32Pまたはビオチン-dUTPで標識したプローブを、クローニングした PCR生成物からの遺伝子の特定の領域について発生させた。プローブをニトロセルロースに結合したゲノム DNAにハイブリダイゼーションさせ、プローブにハイブリダイゼーションする染色体 DNA断片の大きさの固定を可能とした。遺伝子の5'および3'領域をカバーするプローブの使用により、1または2以上の DNA断片がポリメラーゼのための遺伝子遺伝子の全部でないにしても大部分を含有することが保証される。クローニングを促進するために、単一の DNA断片またはいくつかの DNA断片中に構造遺伝子を含有する断片を生成するために使用することができる制限酵素を固定することができる。

いったん固定した後、Tae DNAポリメラーゼ遺伝子をコードする染色体の DNA断片をクローニングした。染色体 DNAを固定された制限酵素で消化し、そして大きさを分別した。所望の大きさの領域を含有する分画を回収し、脱塩し、そしてBSN13H: BglII のクローニングベクター中にクローニングした。既にクローニングした PCR生成物から発生した標識したプローブを使用するハイブリダイゼーションによりクローンを固定した。次いで、PCR生成物をポリアクリルアミドゲル上で分析した。

上に示した DNA配列およびアミノ酸配列並びにそれらの配列をコードする DNA化合物を使用して、組み換え DNA発現ベクターを設計および組成して、広範な範囲の宿主細胞中での Tae DNAポリメラーゼ活性の発現を促進することができる。上に示した DNA配列のすべてまたは一部分をコードする DNA化合物もまた、プローブとして使用して、他の生物体からの高安定性ポリメラーゼをコードする DNAを固定することができ、そして上に示したアミノ酸配列を使用して、高安定性ポリメラーゼの固定および複製に使用できる抗体の調製に

おける免疫原として使用するためのペプチドを設計することができる。

しかしながら、上のアミノ酸配列をコードする組み換えベクターによるか、あるいは天然サーマタガ・マリチマ (*T. paritica*)細胞により生産されたかどうかにかかわらず、Tae DNAポリメラーゼは、実質的には、複製した後、組み換え DNA技術において使用する。本発明はこのような用途性を提供する。

天然タンパク質を回収するために、細胞を任意の適切な技術を使用して均質させる。簡単に述べると、細胞は次の成分を含有する「HWS」培地の中で均質させる(1リットル当たり): NaCl(6.03 g): H₂SO₄・7H₂O(1.75 g): HgCl₂・6H₂O(1.38 g): KCl(0.16 g): NaBr(25mg): H₂BO₃(7.5mg): SrCl₂・6H₂O(3.8mg): KI(0.025mg): CaCl₂(0.38 g): KH₂PO₄(0.5 g): Na₂S(0.5 G): (NH₄)₂NI(SO₄)₂(2mg): 鶏卵のミレラル(Batchra, *Microbiol. Rev.*, 43:280-296)(15ml); レサズリン(1mg); および口粉(5 g)、pH8.5(H₂SO₄で調整した)。固体培地上での均質のために、0.8%の酸素(Oxoid)を培地に添加することができる。細胞の含菌的均質はまた、0.5%の酵母エキスを補充した「SMB」培地(Stettlerら、1983, *Syst. Appl. Microbiol.*, 4: 635-651)中で、あるいはマリンブロス(marine broth)(Difco2216)の中で起こる。

細胞の均質後、均質の早および初産を8段階で実施し、それらの各々は、特定の限りの、口以下の口、好ましくは約0度〜約4度において実施する。第1段階または工程において、細胞を、それが凍結されている場合は、融解し、アミンコ・フレッシュ・プレッシャー・セル(Aminco fresh pressure cell(8~20,000psi)の中で磨碎し、緩衝液(約pH 7.5)中に懸濁させ、そして超音波処理して粘度を減少させる。

第2段階において、硫酸アンモニウムをリゼイトに添加して、Tae DNAポリメラーゼが DNAまたは細胞リゼイトのタンパク質に結合するのを防止する。また、第2段階において、ポリミン(Polymin)P(ポリエチレンジアミン、PEI)をリゼイトに添加して、硫酸を沈降させ、そしてリゼイトを過心する。

第3工程において、硫酸アンモニウムを上澄み液に添加し、そして上澄み液を0.3Mの硫酸アンモニウムおよび0.5mMのDTT(ジチオスレイトール)を含有するTE(50mMのトリス-CI、pH7.5)により平衡化したフェニルセファローズ(Sephacrose)カラム上に負荷する。次いでこのカラムを同一の緩衝液で、第2にTE-DTT(硫酸アンモニウムを含まない)で、第3にエチレンジアミン-TE-DTTで、そして最後にエチレンジアミンを含有するTE-DTT中2Mの尿素で洗脱する。フェニルセファローズの容量を超える(すなわち、約20~30mgのタンパク質/mlの試料より多くを負荷することによって)ことがない限り、Taeポリメラーゼ活性のすべてはカラムにより保持され、そしてエチレンジアミンを含有するTE-DTT中の2Mの尿素で洗脱される。

第4段階において、尿素の洗脱液を、0.08MのKCl、50mMのトリス-CI(pH 7.5)、0.1mMのEDTA、0.2%のツイーン20および0.5mMのDTTにより平衡化したヘパリンセファローズカラムに適用する。次いで、カラムを同一の緩衝液で洗脱し、そして尿素を0.08M~0.5MのKClの勾配で洗脱する。ピーク活性分画は0.225M~0.275MのKClにおいて見いだされた。

第5段階において、第4段階において見められた分画をKClを含まないアフィゲル(affigel)-ブルー緩衝液で稀釈し、そして25mMのトリス-CI(pH 7.5)、0.1mMのEDTA、0.2%のツイーン20、0.5mMのDTT、および0.16MのKClの中で平衡化したアフィゲルブルー

カラムに適用する。このカラムを同一の緩衝液で洗脱し、そして同一の緩衝液中の0.15M~0.7MのKClの勾配で洗脱する。ピーク活性分画は勾配の0.3M~0.55MのKClにおいて見いだされた。次いでピーク活性のこれらの分画を、任意の適切な手順を使用して汚染デオキシリボヌクレアーゼ(エンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼ)について試験する。1例として、エンドヌクレアーゼ活性は、過剰のDNAポリメラーゼとのインキュベーション後、ファージDNAまたはスーパーコイルドのプラスミドDNAの分子口の変化から電気泳動的に決定することができる。同様に、エキソヌクレアーゼ活性は、過剰のDNAポリメラーゼとのインキュベーション後、制限酵素で消化したDNAの分子口の変化から電気泳動的に決定することができる。デオキシリボヌクレアーゼ活性をもたない分画をプールし、そして90mMのKClを含有するホスホセルロースの緩衝液の中に透析処理する。

最後に、第6段階において、第5段階からの透析処理したプールを、25mMのトリス-CI(pH 7.5)、50mMのKCl、0.1mMのEDTA、0.2%のツイーン20および0.5mMのDTTの正しいpHおよびイオン強度に平衡化した、ホスホセルロースのカラム上に負荷する。次いで、このカラムを同一の緩衝液で洗脱し、そして0.05M~0.5MのKClの勾配で洗脱する。ピーク分画は0.215M~0.31MのKClにおいて洗脱された。これらの分画からの、分離していない均質されたDNAポリメラーゼは、イン-シチュエーションゲルにおける変化しない移動パターンにより証明される。

サーマタガ・マリチマ(*Thermotoga paritica*)から回収されたDNAポリメラーゼの分子量は、任意の技術により、例えば、タンパク質の分子重量マーカーを使用するSDS-PAGEによるか、あるいはコード配列の計算により決定することができる。サーマタガ・マリチマ

(*Thermotoga parvula*)の抽出された DNAポリメラーゼの分子量は、SDS-PAGEにより、約97kDaであると決定される。予備されたアミノ酸配列に基づいて、分子量は約102kDaで決定される。天然 Taa DNAポリメラーゼの精製のプロトコルは、実施例1により詳細に記述されている。本発明の粗製 Taaポリメラーゼの精製は、同様の方法により実施することができる。

種々の分子量の生物学的に活性な粗製 Taaポリメラーゼは、本発明の方法およびベクターにより回収することができる。Taa DNAポリメラーゼ遺伝子の完全なコード配列が大腸菌 (*E. coli*)中の発現ベクターの中に存在するときでさえ、細胞は、位置 140におけるメチオニンのコドンで開始する翻訳により形成された切断されたポリメラーゼを生産する。また、Taaのコード配列の位置 284におけるメチオニンのコドンにおいて翻訳を開始することによって生産されるタンパク質に相当する切断ポリメラーゼの生産のために、組み換え手段を使用することができる。アミノ酸 1~139(約86kDa)を欠加するポリメラーゼおよび野生型 Taaポリメラーゼのアミノ酸 1~283(約70kDa)を欠加するポリメラーゼは、ポリメラーゼ活性を保持するが、弱化した 5'→3' エキソヌクレアーゼ活性を有する。さらに、70kDa のポリメラーゼは天然 Taaポリメラーゼより有意に低い安定性である。

こうして、完全な Taa DNAポリメラーゼ1群の全体の配列は活性のために要求されない。粗製 DNA技術において、Taa DNAポリメラーゼ1のコード配列の部分を使用して、DNAポリメラーゼ活性をもつ生物学的に活性な遺伝子生産物を生産することができる。

Taa DNAポリメラーゼの配列をコードする DNAの入手可能性はまた、DNAポリメラーゼ活性を有するムチン(突然変異タンパク質)の形態を発生させるためにコード配列を修飾する機会を提供する。

このような発現は、Taa DNAポリメラーゼ遺伝子のコントロール配列によるか、あるいは Taa DNAポリメラーゼを発現するために選択された宿主中で(その宿主がなにであらうと)機能するコード配列により、指示されることができる。

こうして、本発明は、種々の宿主系に適用可能な発現ベクターを形成することができる Taa DNAポリメラーゼのためのコード配列および発現されるコード配列を提供する。Taaポリメラーゼをコードする配列の部分はまた、種々の種における他の熱安定性ポリメラーゼをコードする配列を回復するプローブとして有用である。したがって、少なくとも4~6つのアミノ酸をエンコードするオリゴヌクレオチドのプローブを合成し、そして熱安定性ポリメラーゼをエンコードする追加の DNAを探索するために使用することができる。サーモタガ・マリチマ(*Thermotoga maritima*)の熱安定性 DNAポリメラーゼの遺伝子のヌクレオチド配列と他の種の対応する遺伝子との間に正相合致は存在しないであろうから、誤った陽性を排除するために十分なストリンジエンシーの条件下にハイブリダイゼーションを得るために、ほぼ12~18ヌクレオチドを含有するオリゴマー(4~6アミノ酸をコードする)が通常必要である。6アミノ酸をコードする配列は、このようなプローブのために十分な情報を提供する。このようなオリゴヌクレオチドのプローブを、本発明の縮短プライマー法においてプライマーとして使用して、熱安定性ポリメラーゼをコードする断片配列を得ることができる。

したがって、本発明は、Taa DNAポリメラーゼのためのコード配列およびアミノ酸配列を提供することによって、他の熱安定性ポリメラーゼ探索およびそれらの探索のためのコード配列の単回を可能とする。Taa DNAポリメラーゼ1タンパク質のアミノ酸配列は、Taq および Tih の熱安定性 DNAポリメラーゼのアミノ酸配列に非常に類

Taaポリメラーゼのアミノ(N)一末端部分はポリメラーゼ活性に不必要であり、むしろタンパク質の5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をコードする。粗製 DNA法を使用して、Taa遺伝子のN一末端のコード配列のほぼ1/3を欠失し、クローニングし、そしてポリメラーゼのアッセイにおいて非常に活性である遺伝子生産物を発現することができるが、欠失の程度に依存して、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有する。ポリメラーゼのある種のN一末端の短縮された形態は活性であるので、これらのポリメラーゼの発現のために使用する遺伝子組成体はコード配列の対応する短縮された形態を含むことができる。

N一末端の除去に加えて、Taaポリメラーゼのペプチド鎖中の種々のアミノ酸残基は、酸化、還元、または他の修飾体化により修飾することができる。そしてタンパク質を切断して活性を保持する断片を得ることができる。活性を喪失しないこのような変異は、そのタンパク質をTaaポリメラーゼ活性をもつタンパク質の定義から除外せず、それゆえ本発明の範囲内に包含される。

Taa DNAポリメラーゼのコード配列の一次挿入を欠失、付加または変異して、そのコード配列から生成されたmRNAの翻訳の間にTaa DNAポリメラーゼの中に組み込まれるアミノ酸配列を変化させることは、タンパク質の高阻のDNAポリメラーゼ活性を喪失しないで、実施することができる。このような変異または他の変異は、本発明の考えられる範囲内に入るDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質を生産する。同様に、Taa DNAポリメラーゼ遺伝子のクローニングされたゲノム配列または相同の合成配列を使用して、Taa DNAポリメラーゼ活性をもつ融合ポリペプチドを発現すること、あるいは天然 Taa DNAポリメラーゼのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列をもつタンパク質を発現することができる。さらに、

似する。これらの類似性は、Taa DNAポリメラーゼのコード配列の同定および単原を促進した。これらの3つの熱安定性 DNAポリメラーゼのコード配列における類似領域は、配列を並列させることによって容易に識別することができる。

しかしながら、3つの熱安定性 DNAポリメラーゼのコード配列の間の不一致の領域をプローブとして使用しても、熱安定性ポリメラーゼの探索をコードする他の熱安定性ポリメラーゼのコード配列を同定することができる。例えば、Taqのいくつかの性質およびTaaの他の多様な性質を有する熱安定性ポリメラーゼのコード配列を、TaqとTaaとの間の非類似性の領域をコードする配列に向けられたプローブを使用することによって同定することができる。詳しくは、このような領域は、アミノ酸配列コードネートにより同定される、次の任意の1または2以上領域からの4またはそれ以上の連続するアミノ酸のストレッチを包含する(番号を包含する): 5-10, 73-79, 113-119, 134-145, 191-196, 328-340, 348-352, 382-387, 405-414, 467-470, 495-499, 506-512, 555-559, 579-584, 595-599, 650-655, 732-742, 820-825, 850-856。これらの領域は「ホールマークのモチーフ(hallmark motifs)」として与えられ、そして熱安定性 DNAポリメラーゼの機能(例えば、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性、およびDNAポリメラーゼ活性)のために必要なアミノ酸のシグネチャー(signature)配列の追加の領域を定める。

Taa DNAポリメラーゼの中に見いだされるが、天然 Taq DNAポリメラーゼおよび天然 Tih DNAポリメラーゼにおいて欠加する1つの性質は、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性である。この3'→5'エキソヌクレアーゼ活性は、一度に望ましいと与えられる。なぜなら、合成された核酸配列の誤って組み込まれたまたは不一致の塩基

がこの活性により抑制されるからである。したがって、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性をもつポリメラーゼ（例えば、Taa DNAポリメラーゼ）を併用するPCRの増幅性は増加する。Taa DNAポリメラーゼの中に見いだされる3'→5'エキソヌクレアーゼ活性はまた、PCRにおけるプライマー/2重体複合体の形成の効率を減少する。3'→5'エキソヌクレアーゼ活性は、複製、非複製依存性の方式で融合されたヌクレオチドを除去することによって、非複製依存性の方式でのプライマーの3'末端への余分のdNTPの結合を防止する。3'→5'エキソヌクレアーゼ活性は、一本鎖のDNA、例えば、プライマーまたは一本鎖の鎖を抑制することができる。本質的に、一本鎖のプライマーまたは鎖型の各ヌクレオチドは不一致として探索により発見され、したがって分解される。PCRにおけるプライマーの分解を回避するために、ホスホロチオエートをプライマーの3'末端に付加することができる。ホスホロチオエートで修飾されたヌクレオチドは3'→5'エキソヌクレアーゼによる除去に対していっそう抵抗性である。

熱安定性 DNAポリメラーゼにおける3'→5'エキソヌクレアーゼ活性のために重要なアミノ酸の「モチーフ」または特徴ある「シグネチャ配列」は、3つの短いドメインからなるとして定義することができる。下において、これらのドメインはA、BおよびCとして定義され、重要なアミノ酸残基は1文字の略号で示されておりそして重要でない残基は「x」として記号されている。

ドメイン	配列	代表的なTaaコード
A	DxxxxL	323-329
B	HxxxDxxL	385-393
C	YxxxD	464-468

領域Aと領域Bとの間の距離は55-65アミノ酸である。領域Bと

領域Cとの間の距離は67-75アミノ酸、好ましくは約70アミノ酸である。Taa DNAポリメラーゼにおいて、重要なモチーフのシグネチャ配列を定義しないアミノ酸配列は、ドメインAにおいて、それぞれ、しおよびTSS；ドメインBにおいて、それぞれ、LKPおよびYKV；およびドメインCにおいてSCEである。したがって、Taa DNAポリメラーゼIにおいて、ドメインAはDLETSSLであり；ドメインBはNLKFDYKVLであり；そしてドメインCはYSCEDである。こうして、本発明は、ドメインA、BおよびCを含んでなり、そして、さらに具体的には、D-X-E-X'-L-X'-N-X'-D-X'-L-X'-Y-X'-Dを含んでなる3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する熱安定性 DNAポリメラーゼを提供し、ここで1文字の略号を使用し、そしてX'は特定したアミノ酸の間の位置でないアミノ酸の符号(N)を表す。

熱安定性3'→5'エキソヌクレアーゼのドメインは、Taa DNAポリメラーゼのアミノ酸291-484により表される。したがって、「ドメインのシャッフリング(domain shuffling)」または「熱安定性キメラ DNAポリメラーゼ」の形成を使用して、所望の性質を有する熱安定性 DNAポリメラーゼを得ることができる。例えば、コドン約291-484を含んでなるTaa DNAポリメラーゼのコード配列よりサーマス・アクアチクス(*Thermus aquaticus*) DNAポリメラーゼのコドン289-422を置換すると、Taq DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼのドメイン(1-289)、Taa DNAポリメラーゼの3'→5'エキソヌクレアーゼのドメイン(291-481)、およびTaq DNAポリメラーゼ(423-832)の DNAポリメラーゼのドメイン(423-832)を含有する所望の熱安定性 DNAポリメラーゼが生成するであろう。あるいは、Taa DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼのドメインおよび3'→5'エキソヌクレアーゼのド

メイン(約コドン1-484)を、Taq DNAポリメラーゼの DNAポリメラーゼの(dNTP結合性およびプライマー/鎖型結合性ドメイン)部分(約423-832コドン)に融合することができる。ドナーおよびレシピエントはTaqおよびTaa DNAポリメラーゼに限定することは必要ではない。Tth DNAポリメラーゼはTaq DNAポリメラーゼと類似するドメインを提供する。さらに、Tth DNAポリメラーゼの増強した/好ましい逆転写増幅の性質は、上に例示した3'→5'エキソヌクレアーゼのドメインを付加することによってさらに増強することができる。

図々の手段の任意のものを使用してキメラ DNAポリメラーゼのコード配列(所望の性質を有する)を発生することができるが、好ましい方法は「オーバーラップ」PCRを使用する。この方法においては、立脚する近接配列をPCRプライマー(それらの5'-末端)にデザインして入れる。図々のドメインの最初の増強の後、図々の生成物を増強し(約100-1000倍)そして組み合わせ、変性し、アニーリングし、伸長し、次いで最終の前プライマーおよび逆プライマーをそれ以外は標準のPCRのために添加する。

こうして、Taa DNAポリメラーゼの3'→5'エキソヌクレアーゼをコードする配列をTaa DNAポリメラーゼから除去するか、あるいは組換え DNA法によりこの活性を欠如する他のポリメラーゼに付加することができる。非熱安定性 DNAポリメラーゼにおいて、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性のドメインをTaa DNAポリメラーゼの熱安定性3'→5'エキソヌクレアーゼのドメインで置換することさえ可能である。同様に、非熱安定性 DNAポリメラーゼの3'→5'エキソヌクレアーゼ活性のドメインを使用して、Taa DNAポリメラーゼ(または任意の他のポリメラーゼ)の3'→5'エキソヌクレアーゼのドメインを置換して変異の有用なポリメラーゼをつくること

ができる。当業者が認識するように、上記のキメラポリメラーゼは組換え DNA技術により最も容易に形成される。同様なキメラポリメラーゼは1つの DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼのドメインを他の DNAポリメラーゼに移動させることによって形成することができる。

天然 Taa DNAポリメラーゼと同一の宿主またはその宿主の増殖体または相同体を生産しようとするかどうかにかかわらず、Taa DNAポリメラーゼの組換え体の生産は、典型的には、発現ベクターの形成、そのベクターによる宿主細胞の形質転換、および発現が起る条件下での形質転換された宿主細胞の増殖を包含する。

発現ベクターを形成するために、成熟(ここで、すべてのキメラまたは役員タンパク質を包含するように使用する)宿主あるいは宿主性を改変しない追加の配列への、または活性タンパク質を生成するコントロールされた条件(例えば、ペプチダーゼによる処理)下に切断可能な追加の配列への Taa DNAポリメラーゼの融合体をコードする DNAを挿入。次いで、コード配列を発現ベクターの中の追加のコントロール配列と作用可能な近接で配列する。ベクターは宿主細胞の中で自動的に複製するように、あるいは宿主細胞の熱安定性 DNAの中に組み込むように設計することができる。このベクターを使用して追加の宿主を形質転換し、そして形質転換された宿主を組換え Taa DNAポリメラーゼの発現のために追加の条件下で増殖させる。この Taa DNAポリメラーゼを増殖または細胞から回収するが、タンパク質の回収および回収はある場合において必要でないことがある。

前記の工程の各々は図々の方法で実行することができる。例えば、所望のコード配列をゲノムの断片から回収し、そして追加の宿主において直接使用することができる。図々の宿主において作用可能な発現ベクターの形成は、一般に投与するように、明白なレプリコン

およびコントロール配列を使用して区別する。所望のコード配列およびコントロール配列を含有する適当なベクターの形成は、この分野においてよく知られている標準的技術および制限酵素法を使用する。形成されたプラスミド、DNA配列または合成されたオリゴヌクレオチドを切断し、区別し、そして所望の形態に再結合する。適当な制限部位を、通常存在しない場合、下に指示するように、コード配列の末端に付加して発現ベクターの形成を促進することができる。

部位特異的な DNA の切断は、一般にこの分野において知られておりかつ商賣的に入手可能な酵素の製造業者により提供されている条件下に、適当な 1 種または 2 種以上の制限酵素で処理することによって実施する。例えば、ニュー・イングランド・バイオラプス (New England Biolabs) の製品カタログを参照のこと。一般に、約 1 μ g のプラスミドまたは他の DNA を約 20 μ l の緩衝液の中で 1 単位の酵素により切断する；下位の量の場合において、過剰の制限酵素を一般に使用して DNA の完全な消化を保證する。約 37°C において約 1~2 時間のインキュベーション時間が適当であるが、変更も許容される。各インキュベーション後、タンパク質をフェノールまたはクロロホルムを使用する抽出により取り除く；この抽出に引続き、エーテルの抽出およびエタノール沈殿により水分相からの DNA の回収を実施することができる。必要に応じて、切断された断片のサイズ分岐を、標準的技術を使用して、ポリアクリルアミドゲルまたはアガロースゲルの電気泳動により実施することができる。例えば、Methods in Enzymology, 1980, 65: 499-560 を参照のこと。

一本鎖の「オーバーラッピング」末端をもつ制限切断された断片は、4 種類のデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) の存在下に約 15~25 分のインキュベーション時間を使用して 20°C~25°C において、

50mM のトリス pH 7.8、50mM の NaCl、100mM の HgCl₂、10mM の DTT および 5~10 μ M の dNTP の中で、大腸菌 (*E. coli*) DNA ポリメラーゼ I (クレノー) の大断片で処理することによって平滑末端化 (二本鎖の末端) することができる。必要に応じて、突出する末端の性質により決定される制限内で 1 のみのまたは選択された dNTP を供給することによって、選択的修飾を実施することができる。クレノーによる処理後、この混合物をフェノール/クロロホルムで抽出し、そしてエタノール沈殿させる。同様な結果は S1 ナクレアーゼを使用して達成することができる。なぜなら、適当な条件下の S1 ナクレアーゼによる処理は複製の一本鎖部分の加水分解を生ずるからである。

合成のオリゴヌクレオチドは、Haitheucci ら、J. Am. Chem. Soc., 103: 3185-3181 のトリエステル法、または自動化された合成法を使用して製造することができる。アニーリングの前または修飾のための一本鎖のキナーゼ処理は、50mM のトリス (pH 7.8)、10mM の HgCl₂、5mM のジチオスレイトール (DTT) および 1~2 μ M の ATP の存在下に 0.5 μ M の基質に対して過剰の、例えば、ほぼ 10 単位のポリヌクレオチドキナーゼを使用して達成される。キナーゼ処理がプライマーの修飾化のためである場合、ATP は高い比活性の γ -³²P を含有するであろう。

連結は 15~30 μ l の体積で次の標準的条件および温度で実施される：20mM のトリス-HCl (pH 7.5)、100mM の HgCl₂、10mM の DTT、39 μ g/ml の BSA、10mM~50mM の NaCl、および 0°C において 40mM の ATP および 0.01~0.02 (Weiss) 単位の T4 DNA リガーゼ (相対的一本鎖の末端をもつ断片の結合のため) あるいは 14°C において 1mM の ATP および 0.3~0.6 単位の T4 DNA リガーゼ (二本鎖末端) の結合のため)。相対的末端をもつ断片の分子相互の結合は、通常、33~100 μ g/ml の合計 DNA 濃度 (5~100mM の合計末端濃度) で実施

する。分子相互の平滑末端の結合 (必要に応じて、20~30 倍のモル過剰のリンカーを使用する) は 1 μ M の合計末端濃度において実施する。

ベクターの形成において、ベクターの断片を細菌のまたは酵母のアルカリ性ホスファターゼ (BAP または CIAP) で処理して 5' のホスフェートを除去し、そしてベクターの再結合および再形成を防止する。BAP および CIAP の消化条件はこの分野においてよく知られており、そして発露されたプロトコルは通常商賣的に入手可能な BAP および CIAP 酵素に伴う。核酸断片を回収するために、混合物をフェノール/クロロホルムで抽出し、そしてエタノール沈殿させて AP を除去し、そして DNA を精製する。あるいは、再結合は、所望のベクターとの結合の前段に、不必要なベクターの制限酵素消化により防止することができる。

配列の修飾を必要とするベクターまたはコード配列の部分のために、種々の部位特異的プライマー-指令要員同義法を利用することができる。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を使用して部位特異的変異酵素を製造することができる。現在この分野において標準的である他の技術において、所望の突然変異をコードする合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして使用して、変異プライマーの伸長生産物の形成のための模型として同く一本鎖ベクター、例えば、pBS13+ の相対的酸配列の合成を指令する。変異原された DNA を宿主細胞中に形質転換し、そして形質転換された細胞の培養物をプレートし、そして測定する。修飾されたベクターの測定は、ニトロセルロースのフィルターまたは他の膜への選択された形質転換体の転移、および修飾された配列への正確な融合を許すが、もとの膜へのハイブリダイゼーションを防止する温度においてキナーゼ処理した合成プライマーとハイブリダイズした「リフト (lifts)」を含む。次の

で、プローブとハイブリダイゼーションする DNA を含有する形質転換体を培養し、そして修飾された DNA の測定として使用する。

下に記述する形成において、プラスミドの形成のために正しい連結は、大腸菌 (*E. coli*) DG101 株または他の適当な宿主をまず連結混合物で形質転換することによって保證される。適当な形質転換体を、この分野において知られているように、プラスミドの形成のモードに依存して、アンピシリン、テトラサイクリンまたは他の抗生物質耐性によるか、あるいは他のマーカーを使用することによって選択する。次いで、形質転換体からのプラスミドを、Clenell ら、1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 62: 1159, の方法に従い、必要に応じてクロランフェニコール均質 (Clenell, 1972, J. Bacteriol., 110: 867) 後に処理する。プラスミド DNA を得る他の方法は、ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ (Bethesda Research Laboratories) の刊行物の Focus, Vol. 5, No. 2, のページ 11 に「Base-Acid」として記載されており、そして非常に稀なプラスミド DNA はそのプロトコルの工程 12~17 を DNA の CsCl/臭化エチジウムの密度勾配で置き換えることによって得ることができる。形成された DNA は、制限酵素の消化により分析し、そして/または Sanger ら、1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463, さらに Messing ら、1981, Nucl. Acids Res., 9: 309, に記述されているジデオキシ法によるか、または Maxam ら、1980, Methods in Enzymology, 65: 498 の方法により配列決定する。

コントロール配列、発現ベクターおよび形質転換法は、遺伝子の発現に使用する宿主細胞のタイプに依存する。一般に、原核生物、酵母菌、昆虫、または哺乳動物の細胞を宿主として使用する。原核生物の宿主は、一般に、組換えタンパク質の生産に最も適当かつ便利であり、したがって Tna ポリメラーゼの発現のために好まし

い。

遺伝子タンパク質の発現のために最も頻りに使用されている原核生物は大腸菌 (*E. coli*) である。クローニングおよび配列のために、および大部分の遺伝子プロモーターのコントロール下の遺伝子の発現のために、大腸菌 (*E. coli*) ジェネティック・ストック・センター (Genetic Stock Center) から GCSC # 8135 のもとに入手可能な、大腸菌 (*E. coli*) K12 HB294 株を宿主として使用することができる。P₁N₃ コントロール配列をもつ発現ベクターのために、大腸菌 (*E. coli*) K12 菌株 HC1000 ラムダ複製系、N₃N₃...I...SusP... ATCC39531 を使用することができる。1987年4月7日にATCCに (ATCC53606) として受託された大腸菌 (*E. coli*) DG116 および 1985年3月29日にATCCに (ATCC53075) として受託された大腸菌 (*E. coli*) K82 もまた、有用な宿主である。M13 ファージ複製体のために、ファージに感染されやすい大腸菌 (*E. coli*) 菌株、例えば大腸菌 (*E. coli*) K12 菌株 DG98 を使用する。DG98 菌株は 1984年7月13日にATCCに (ATCC39788) として受託された。

しかしながら、T₇ DNAポリメラーゼの複製発現のために、大腸菌 (*E. coli*) 以外の微生物の菌株、例えば、バチルス、例えば、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、シュードモナス (*Pseudomonas*) の菌株の菌株、および他の細菌の菌株をまた使用することができる。このような原核生物系において、肉眼的には、宿主または宿主と適合性の菌から誘導された複製起点およびコントロール配列を含有するプラスミドのベクターを使用する。

例えば、大腸菌 (*E. coli*) は、典型的には、Bolivarら、1977, *Gene*, 2: 95 に記載されている pBR322 の複製体を使用して形質転換される。プラスミド pBR322 はアンピシリン耐性およびテトラサイクリン耐性のための遺伝子を含有する。これらの薬物耐性のマーカー

は、所望のベクターを構成すると、複製または発現することができ、それゆえ所望の遺伝子の存在の発現を促進することができる。複製に使用される原核生物のコントロール配列、すなわち、リボソーム結合部位の配列と共に、必要に応じてオペレーターを含む、転写開始のためのプロモーターは次のものを包含する：β-ラクタマーゼ (ベニシリナーゼ) およびラクトース (*lac*) プロモーター系 (Changら、1977, *Nature*, 198: 1056)、トリプトファン (*trp*) プロモーター系 (Goeddelら、1980, *Nucl. Acids Res.*, 8: 4057) およびラムダ由来 P₁ プロモーター (Shimada 等、1981, *Nature*, 292: 128) および N-遺伝子リボソーム結合部位 (N₃...)。ポータブルのコントロールシステムのカセットは、米国特許第 4,711,845 号 (1987年12月8日発行) に記載されている。このカセットは、N₃... 配列の 6 bp の 3' 内で切断可能とする少なくとも 1 つの制限部位を有する 3 DNA 配列より上流に位置する N₃... に作用可能に類似した P₁ プロモーターを含む。また、Changら、欧州特許公開 196,864 号 (1986年10月8日発行) に記載されているホスファターゼ A (*phoA*) は有用である。しかしながら、原核生物と適合性の任意の入手可能なプロモーター系を使用して、本発明の T₇ 発現ベクターを構成することができる。

T₇ インサートのタクロチド配列は、上流のリボソーム結合部位の効率にマイナスに影響を与え、低いレベルの遺伝子発現を誘起することができる。T₇ 遺伝子の配列は、発現ベクターの「遺伝的にカップリングされた」遺伝子の発現により増強することができる。短いコード配列のための停止コドンが T₇ 遺伝子コード配列のための ATG 開始コドンと「カップリング」するように、T₇ 遺伝子のコード配列からちょうど上流に第 2 遺伝子開始シグナルおよび短いコード配列をもつ発現ベクターを構成することができる。

遺伝子を効率よく開始する第 2 の遺伝子開始シグナルを、T₇ 遺伝子の開始コドンの上流に挿入することができる。例えば、1 つの発現系は、TrpE の最後の 6 コドンにインフレームで融合された T₇ バクテリオファージの主要キャプシドタンパク質 (遺伝子 10) の最初の 10 コドンおよび遺伝子開始シグナルを利用することができる。TrpE のための TGA (停止) コドンを、T₇ 遺伝子のコード配列のための ATG (開始) コドンと「カップリング」させて、TCATG を形成する。短いコード配列の遺伝子と T₇ のコード配列の遺伝子の間に、1 塩基のフレームシフトが要求される。これらの誘導体の発現ベクターは複製 DNA 法により形成することができる。

遺伝コードの重複もまた、低い遺伝子効率に関係づけることができる。典型的には、同一のアミノ酸をコードする複数のコドンが存在するとき、可能なコドンの 1 つが生物体において優先的に使用される。しばしば生物体は特定の遺伝子に相当する tRNA を含む。コドン使用のパターンがサーモフィラ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) と宿主細胞との間で異なる場合、T₇ ポリメラーゼの遺伝子の遺伝子に必要 tRNA は豊富でない場合がある。T₇ のコード配列において、アルギニンは「AGA」コドンにより最も頻りにコードされるが、このコドンは大腸菌 (*E. coli*) の遺伝子において低い頻度で使用され、そして対応する tRNA は大腸菌 (*E. coli*) 宿主細胞において低い濃度で存在する。結局、「AGA」コドンのための「ArgU」tRNA の大腸菌 (*E. coli*) 宿主細胞における低い濃度は、大腸菌 (*E. coli*) 宿主細胞における T₇ ポリメラーゼ遺伝子の RNA の遺伝子効率を制限することができる。大腸菌 (*E. coli*) 宿主細胞内の T₇ のコード配列の遺伝子効率は、この tRNA 遺伝子の多数のコピーを宿主細胞の中で発現させることによって、この Arg tRNA の濃度を増加することによって改良

することができる。

細菌に加えて、真核性微生物、例えば、酵母菌もまた複製宿主細胞として使用することができる。サッカロミセス・セレビシア (*Saccharomyces cerevisiae*) の菌株は最も頻りに使用されるが、他の多くの菌株が容易に入手可能である。2 ミクロン複製起点を使用するベクターが容易である (Broach, 1983, *Methods Enzymol.*, 101: 307) が、酵母菌の発現に相当する他のプラスミドベクターが既知である (参照、Stinchcombら、1979, *Nature*, 292: 39; Tchenら、1980, *Gene*, 10: 157; および Clarkeら、1983, *Methods Enzymol.*, 101: 300)。酵母ベクターのためのコントロール配列は、酵母系酵素の合成のためのプロモーターを包含する (Hessら、1968, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7: 149; Hollandら、1978, *Biotechnology*, 17: 4900; および Hollandら、1981, *J. Biol. Chem.*, 256: 1385)。この分野において知られている追加のプロモーターは、次のものを包含する：3-ホスホグリセレートキナーゼのためのプロモーター (Hitzmanら、1980, *J. Biol. Chem.*, 255: 2073) および他酵母系酵素、例えば、グリセルアルデヒド 3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキドキナーゼ、ビルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ビルベートキナーゼ、トリセホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼのためのプロモーター。均質条件によりコントロールされる転写の追加の刺激を有する他のプロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソサイトクロム C、ロビンホスフェターゼ、自家の代謝に関与する酵素、並びにマルトースおよびガラクトースの利用に関係する酵素のためのプロモーターである。

コード配列の 3' 末端に位置すると、ターミネーター配列もま

た役として発現を増大することができる。このようなターミネーターは、母特近接因子の中でコード配列の後の3'非図領域において見いだされる。母特と適合性のプロモーター、起始点、および他の図配列を含有する任意のベクターは、母特の Taa 発現ベクターを組成するときの使用に適する。

Taa 近接因子はまた、多細胞の生物体から誘導された真核生物の宿主細胞の培養物の中で発現させることができる。例えば、Tissue Culture, Academic Press, Cruz および Patterson (1973) 参照のこと。通常の宿主細胞系は、COS-7, COS-A2, CV-1、ネズミの細胞、例えば、ネズミの腎臓細胞 NS1 および VERO, HeLa 細胞、およびチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を包含する。このような細胞のための発現ベクターは通常、次のものを包含する：哺乳動物細胞と適合するプロモーターおよびコントロール配列、例えば、シミアンウイルス 40 (SV40) からの普通型に使用される前部および後部プロモーター (Peters, 1978, Nature, 273: 133)、または他のウイルスのプロモーター、例えば、ポリオマ、アデノウイルス 2、ウシ乳癌ウイルス (BPV)、または鳥類の肉瘤ウイルスから誘導されたプロモーター、または免疫グロブリンのプロモーターおよびヒートショックプロモーター。哺乳動物の系において BPV ベクター系を使用して DNA を発現するための系は、米国特許第 4,419,446 号に開示されている。この系の改良は米国特許第 4,601,978 号に記述されている。哺乳動物細胞の一般的画は、Axel、米国特許第 4,399,216 号に記述されている。「エンハンサー」領域もまた、発現を最適化するために必要である：これらは、一般に、プロモーター領域の上流に見いだされる配列である。複製起点は、必要に応じて、ウイルス系から得ることができる。しかしながら、染色体の中への組み込みは真核生物における DNA の複製のための普通型メカニズムである。

を加熱不活性化することによって実質的に阻害することができる。この工程は、宿主 DNA から Taa DNA ポリメラーゼの膜を阻害し、かつ Taa DNA ポリメラーゼと他の細胞リゼットのタンパク質とのイオンの相互作用を減少するために十分な量の塩（典型的には 0.03 M の硫酸アンモニウム）の存在下に実施する。さらに、0.3M の硫酸アンモニウムの存在はフェニルセファローズカラムとの疎水性相互作用を促進する。疎水性相互作用のクロマトグラフィーは分離技術であり、ここで物質は疎水性基を含有する非荷電ベッド材料との疎水性相互作用の異なる強さに基づいて分離される。典型的には、カラムをまず疎水性結合に好む条件、例えば、高イオン強度の下で平衡化する。その時、下流する塩の勾配を使用して試料を洗出することができる。

本発明によれば、水性混合液（組み換え Taa DNA ポリメラーゼを含有する）を、比較的強い疎水性ゲル、例えば、フェニルセファローズ (Pharmacia 製) またはフェニル (Phenyl) TSK (京セラソーダ製) を含有するカラムに負荷する。フェニルセファローズのカラムとの相互作用を促進するために、例えば、0.3M より高いか、あるいは低い、好ましい 0.3M の硫酸アンモニウム、あるいは 0.5M の高いか、あるいは低い NaCl を含有する溶液を使用する。カラムおよび試料を、また、0.50M の DTT を含有する 50mM のトリス (pH 7.5) および 1.0mM の EDTA (「TE」) 緩衝液中の 0.3M 硫酸アンモニウムに傾倒し、そして試料をカラムに適用する。このカラムを 0.3M の硫酸アンモニウム緩衝液で洗淨する。次いで、緩衝液を疎水性相互作用を弱くする溶液、例えば、減少する塩の勾配、エチレンまたはプロピレングリコール、または尿素で洗淨することができる。天然 Taa DNA ポリメラーゼについて、好ましい緩衝液は TE-DTT 中の 2M の尿素および 20% のエチレングリコールでカラムを洗淨することを包含す

植物の細胞もまた宿主として作用することができ、そして植物の細胞と適合するコントロール配列、例えば、ノバリンシンターゼプロモーターおよびポリアデニル化シグナル配列、(DePietra, 1982, J. Mol. Appl. Genet., 1: 561) が入手可能である。バキュロウイルスベクターにより提供される飼育系を利用する昆虫を使用する発現系もまた、記述されている (Hiller, 1986, Genetic Engineering (Setlow, 編, Plenum Publishing) 2: 277-297)。昆虫に基づく発現はスポドプテラ・フルギペダ (*Spodoptera frugiperda*) において達成することができる。これらの系を使用しても組み換え Taa ポリメラーゼを生産することができる。

宿主細胞に依存して、形質転換はこのような細胞に適切な標準的技術を使用して実施される。Cohen, 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 2110 に記述されているような、塩化カルシウムを使用するカルシウム処理は原核生物または真核細胞のバリエーションを含有する他の細胞のために使用される。アグロバクテリウム・フムファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) による感染 (Shaw, 1983, Gene, 23: 315) は、ある種の植物細胞について使用される。哺乳動物細胞について、Graham および van der Eb, 1978, Virology, 52: 546 のリン酸カルシウム法が好ましい。降膜の中への形質転換は、Van Solingen, 1977, J. Bacteriol., 130: 946 および Hsieh, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 3829 の方法に従い実施される。

一旦 Taa DNA ポリメラーゼが組み換え宿主細胞の中で発現されると、タンパク質の精製が望ましいことがある。粗々の粗製手順を使用して本発明の組み換え熱安定性ポリメラーゼを精製することができるが、より少ない工程を使用して等しい純度の発現産物を製造する必要がある。大腸菌 (*E. coli*) 宿主のタンパク質は感染性であるので、組み換え熱安定性 Taa DNA ポリメラーゼを粗製のリゼイト

る。

長期間の安定性のために、Taa DNA ポリメラーゼ溶液を 1 日または 2 日以上非イオン性ポリマー洗剤を含有する緩衝液の中に貯蔵することができる。このような洗剤は、一般に、ほぼ 100~250,000 ダルトン、好ましくは約 4,000~200,000 ダルトンの分子量を有し、そして pH を約 3.5~約 9.5、好ましくは約 4~8.5 の pH において安定化するものである。このような洗剤の例は、次の文獻に特定されているものを包含する：McCutcheon の Emulsifiers & Detergents, North American 版 (1983), MC Publishing Co. の McCutcheon Division 発行、米国ニュージャージー州グレンロック、ロックロード 175、の 295~298 ページおよび同時出版図第 387,003 号、1989 年 7 月 28 日提出、その開示をここに引用によって加える。

好ましくは、洗剤はエトキシ化脂肪族アルコールエーテルおよびラウリルエーテル、エトキシ化アルキルフェノール、オクチルフェノキシポリエトキシエタノール化合物、酸性オキシエトキシ化および/またはオキシプロピル化脂肪族アルコール、ポリエチレングリコールモノオレート化合物、ポリソルベート化合物、およびフェノール系脂肪族アルコールエーテルから成る群より選択される。フイーン 20、ポリオキシエチル化 (20) ソルビタンモノラウレート (ICI Americas Inc., デラウェア州ウィルミントン) および Iconol NP-40、エトキシ化アルキルフェノール (ノニル) (BASF Wyandotte Corp., ニュージャージー州バールンバニイ) は、さらに好ましい。

本発明の熱安定性溶液は、このような溶液が必要であるか、あるいは望ましい、任意の目的に使用することができる。とくに好ましい緩衝液において、溶液は PCB として知られている核酸塩基反応を阻

媒する。この核酸配列を増幅する方法は、米国特許第 4,683,202号および米国 特許 4,665,188号（それらの各々をここに引用によって加える）に開示および特許請求されている。PCR核酸増幅法は、核酸または核酸の混合物の中に含有されている少なくとも1つの特定の核酸配列を増幅することを包含し、そして最も普通の態様において、二本鎖 DNAを生成する。

説明を容易とするために、下に記載するプロトコルは増幅すべき特定の配列が二本鎖の核酸の中に含有されていると仮定する。しかしながら、この方法は一本鎖の核酸、例えば、mRNAの増幅においても同様に有用であるが、好ましい実施態様において完備の生成物はなお二本鎖 DNAである。一本鎖の核酸の増幅において、第1工程は相補鎖の合成（2つの増幅プライマーの1つをこの目的に使用することができる）を包含し、そして連続する工程は下に記載する二本鎖の増幅法におけるように進行する。

増幅は、工程：

(a) 各核酸鎖を、4つの異なるヌクレオシド三リン酸および増幅されるべき各特定の配列のための2つのオリゴヌクレオチドのプライマーと接触させ、ここで各プライマーを、特定の配列の異なる鎖に対して相補的であり1つのプライマーから合成された伸長生成物がその相補的体から分離されたとき、他のプライマーの伸長生成物の合成のための鎖型として働くように選択し、前記接触を各プライマーが相補的核酸鎖に対してハイブリダイゼーションすることができるよう温度において実施し、

(b) 各核酸鎖を、工程(a)と同時にまたはその後、サーモタガ・マリチマ (*Thermostag maritima*)からの DNAポリメラーゼと接触させ、前記 DNAポリメラーゼはヌクレオシド三リン酸を結合させて特定の核酸配列の各鎖に対して相補的であるプライマー伸長生

成を形成することができるものであり、

(c) 工程(b)からの混合物を、酵素の活性を促進しかつ、増幅される各異なる配列について、各核酸鎖の鎖型に対して相補的である各プライマーの伸長生成物を合成するために有効であるが、各伸長生成物を相補的鎖の鎖型から分離するほど高くない温度において有効な時間の間加熱し、

(d) 工程(c)からの混合物を、プライマー伸長生成物をそれらがその上で合成されて一本鎖の分子を生成する鎖型から分離するために有効であるが、酵素を不可逆的に変性するほど高くない温度に有効な時間の間加熱し、

(e) 工程(d)からの混合物を、工程(d)において生成された一本鎖の分子の各々へのプライマーのハイブリダイゼーションを促進するために有効な温度に有効な時間の間加熱し、そして

(f) 工程(e)からの混合物を、酵素の活性を促進しかつ、増幅される各異なる配列について、工程(d)において生成された各核酸鎖の鎖型に対して相補的である各プライマーの伸長生成物を合成するために有効であるが、各伸長生成物を相補的鎖の鎖型から分離するほど高くない温度に有効な時間の間維持する、

ことを含んでなる。工程(e)および(f)における有効な時間および温度を一致させて、工程(e)および(f)を同時に実施できるようにすることができる。工程(d)～(f)は、所望のレベルの増幅が得られるまで、反復する。

この増幅方法は既知配列の特定の核酸配列を大量に生産するために有用であるばかりでなく、かつまた存在することが知られているが、完全には特定されていない核酸配列を生産するために有用である。配列の両端における十分な数の塩基を十分に詳細に知り、こうして配列に沿った相対的位置における所望の配列の異なる鎖にハイ

ブリダイゼーションする2つのオリゴヌクレオチドのプライマーを調整できるようにし、こうして一方のプライマーから合成された伸長生成物が、鎖型（相補的）から分離されたとき、定義された長さの核酸配列への他方のプライマーの伸長のための鎖型として働くことができるようにする。配列の両端における塩基についての知識が深くなければならないほど、鎖的核酸配列に対するプライマーの特異性およびこの方法の効率をより大きくすることができる。

いずれの場合においても、増幅すべき配列の初期のコピーは入手可能でなくてはならないが、配列は純粋である必要はなく、あるいは個別の分子である必要はない。一般に、増幅方法は連鎖反応を包含し、この連鎖反応は、(a)要求される配列の末端が十分に詳細に知られていて、それらにハイブリダイゼーションするオリゴヌクレオチドを合成することができ、且つ(b)連鎖反応を開始するために少量の配列が入手可能であると、関係する反応工程の数に関して指數的な量で、少なくとも1つの特定の核酸配列を生産する。連鎖反応の生産物は、使用された特定のプライマーの5'末端に対応する末端をもつ個別の核酸二重鎖であろう。

任意の核酸配列を、複製されたまたは複製されない形態で出発核酸として利用することができるが、ただしそれは増幅しようとする特定の核酸配列を含有するか、あるいは含有するとと思われるものであることを条件とする。増幅すべき核酸は、任意の源、例えば、プラスミド、例えば、pBR322から、クローニングした DNAまたは RNAから、あるいは、細菌、酵母菌、ウイルス、細胞小器官、および高等生物、例えば、植物および動物を包含する任意の源からの天然 DNAまたは RNAから得ることができる。DNAまたは RNAは、血液、組織材料、例えば、絨毛膜の絨毛、または羊水細胞から種々の技術により抽出することができる。例えば、Maniatisら、前掲、pp.280

～281を参照のこと。この方法は、例えば、メッセンジャー RNAを包含する DNAまたは RNAを使用することができ、前記 DNAまたは RNAは一本鎖または二本鎖であることができる。さらに、各々の1つの鎖を含有する DNA-RNAハイブリッドを利用することができる。これらの核酸の任意の混合物もまた、使用することができ、また前の増幅反応から核酸を生成することができる（同一であるか、あるいは異なるプライマーを使用する）。増幅すべき特定の核酸配列は大きい分子の一部分のみであるか、あるいは特定の配列が全体の核酸を構成するように、個別の分子として最初から存在することができる。

増幅すべき配列は最初に純粋な形態で存在することは必要ではない；配列は複雑な混合物の小さい部分、例えば、金ヒト DNAの中に含有されるβ-グロブリン遺伝子の一部分(Saikiら、1985、*Science*, 230: 1530-1534において例示されているように)または特定の微生物のために核酸配列の一部分（この生物体は特定の生物学的試料の非常に小さい部分のみを構成するであろう）であることができる。細胞の溶解および細胞内の成分の分離が起こるまで（一般に1～15分）低強度微波の中の懸濁液および約90℃～100℃の熱処理後、細胞を増幅法において直接使用することができる。加熱工程後、増幅試薬を溶解した細胞に直接添加することができる。出発核酸配列は1より多い所望の核酸配列を含有することができる。増幅方法は大量の1つの特定の核酸配列の生産のためにばかりでなく、かつまた同一であるか、あるいは異なる核酸分子上に位置する1より多い異なる特定の核酸配列を同時に増幅するために有用である。

プライマーはPCR法において主要な役割を演ずる。語「プライマー」は、増幅法の説明において使用するとき、とくに 増幅すべき断片の末端の1または2以上の配列に関する情報が多少不明瞭である

場合、あるいは本発明の簡便プライマー法を使用する場合、1より多いプライマーを登録する。例えば、核酸配列をタンパク質配列の初期から転写される場合、遺伝コードの閉鎖性に基いてすべての可能なコドンの多様性を有する配列を含有する1以上のプライマーを登録のために使用する。この配列からの1つのポリマーゼは、均質すべき所望の配列の末梢と十分に相溶性であって、均質のために有用であろう。

さらに、適当な数のオリゴヌクレオチドプライマーを利用するかぎり、1より多い特定の核酸配列を最初の核酸または核酸の混合物から増幅することができる。例えば、2つの異なる特定の核酸配列を生成しようとするとき、4つのプライマーを利用する。プライマーのうちの2つは特定の核酸配列の1つに対して特異的であり、そして他の2つのプライマーは第2の特定の核酸配列に対して特異的である。このようにして、2つの異なる特定の配列の各々を本発明の方法により指数的に生産することができる。

所定の配列内の配列は、反応においてより大きい特異性をえるための所定の増幅サイクル数、少なくとも1つの増幅サイクル後、増幅すべき配列の内部の配列（すなわち、末梢上に存在しない配列）に対して相対的であるプライマーの塩を添加することにより増幅することができる。このようなプライマーは任意の段階において添加することができる、そしてより短い増幅された断片を与えるであろう。あるいは、より長い断片は、非相対的な末梢をもつ増幅において前に利用したプライマーと多少のオーバーラップを有するプライマーを使用することによって増幅することができる。

プライマーはまた、増幅法をin vitroの突然変異誘発のために使用するとき、主要な役割を演ずる。使用するプライマーがもとの配列に正確に相対的でない、増幅反応の生産物は、簡便よりむしろブ

ライマーの配列を含有し、それゆえin vitroの突然変異を導入するであろう。それ以上のサイクルにおいて、それ以上の誤対合のプライミングが要求されないで、突然変異は減少しない効率で増幅されるであろう。前述したように変異されたDNA配列をつくる方法を、異なるプライマーを使用して、変異されたDNAについて反復して、それ以上の配列の変化を導入することができるであろう。このようにして、1系列の突然変異した配列を徐々に生成することができ、ここでその系列への各新しい付加は最良のもの小さい配列に異なるが、もとのDNA配列の配列と非常に大きく異なる。

プライマーはその配列の一部として非相対的配列を含有できるので、プライマーの十分な塩が増幅すべき塩に対して相対的である配列を含有するかぎり、多量の他の利点を実現することができる。例えば、簡便の配列に対して相対的でないヌクレオチド配列（例えば、プライマー、リンカー、コード配列など）をプライマーの1つまたは両方の5'末端に取り付けることができる、それゆえ簡便法の生成物に付加することができる。伸長プライマーを添加した後、十分なサイクルを実施して、非相対的ヌクレオチドのインサートを含有する所望の塩の新しい簡便を得る。これにより、簡便な技術を使用して比較的短い時間（例えば、2時間以内）で、大口の組み合わせられた断片を生産することができる。

オリゴヌクレオチドのプライマーは、任意の適当な方法、例えば、前述のホスホトリエステルまたはホスホジエステルの方法、またはそれらの自己化された塩酸を使用して調製することができる。1つのこのような自己化された塩酸において、ジエチルホルムアルミダイトを出発物質として使用し、そしてBeaucageら、1981, *Tetrahedron Letters*, 22: 1859-1862、に記載されているようにして合成することができる。固体支持体上でオリゴヌクレオチドを合成する1つ

の方法は、米国特許第4,458,066号に記載されている。また、生物学的媒（例えば、制限エンドヌクレアーゼ消化物）から単離されたプライマーを使用することができる。

しかしながら、どのプライマーを使用しても、反応混合物はPCRが起すための簡便を含有しなくてはならない。なぜなら、特定の核酸配列は簡便としてその配列を含有する核酸を使用して生成されるからである。第1工程は、増幅または抽出されるべき各特定の核酸配列について、各核酸鎖を4つの異なるヌクレオシド三リン酸および2つのオリゴヌクレオチドのプライマーと接触することを包含する。増幅または抽出すべき核酸がDNAである場合、ヌクレオシド三リン酸は通常dATP、dCTP、dGTPおよびdTTPであるが、種々のヌクレオチドの簡便体もまたこの方法において使用することができる。ヌクレオシド三リン酸の濃度は広く変化することができる。典型的には、濃度は増幅のための反応液の中で各dNTPにおいて50~200μMであり、そしてMgCl₂は反応液の中に1~3mMの量で存在して、ポリメラーゼを活性化しかつこの反応の特異性を増加する。しかしながら、1~20μMのdNTPの濃度がいくつかの応用、例えば、DNAの配列決定または高い比活性の放射線標識したプローブの発生のために好ましいことがある。

簡便の核酸鎖は、プライマーの伸長生成物である追加の核酸鎖の合成のための簡便として働く。この合成は任意の適当な方法を使用して実施できるが、一般に緩衝化された溶液の中で、好ましくはpH7~9において、最も好ましくはpH約8において起こる。合成を促進するために、モル過剰の2つのオリゴヌクレオチドプライマーを簡便鎖を含有する反応液に添加する。実際には、増幅すべき配列は複雑な長鎖核酸鎖の混合物の中に含有される場合、プライマーの添加量は相対的簡便（簡便）の量を越えたモル過剰である。大モル

過剰がこの方法の効率を改良するために好ましい。したがって、少なくとも100:1またはそれ以上のプライマー：簡便の比を一般にクローニングされたDNAの簡便について使用し、そして約10⁴:1またはそれ以上のプライマー：簡便の比を一般に複雑なゲノムの混合物について使用する。

次いで、簡便、プライマーおよびヌクレオシド三リン酸の混合物を、増幅または抽出されるべき核酸が一本鎖または二本鎖であるかどうかに従い、処理する。核酸が一本鎖である場合、第1伸長サイクルの前に変性工程は不必要であり、そして反応混合物をプライマーのその相対的簡便（簡便）配列へのハイブリダイゼーションを促進する温度に保持する。このような温度は、一般に、有効な時間、一般に数秒~5分、好ましくは30秒~1分について、約35℃~65℃またはそれ以上、好ましくは約37℃~80℃である。35℃~70℃のハイブリダイゼーション温度をTma DNAポリメラーゼについて使用することができる。長さが15ヌクレオチドまたはそれより長いプライマーを使用して、プライマーのハイブリダイゼーションの特異性を増加する。より短いプライマーはより低いハイブリダイゼーション温度を必要とする。

もとの一本鎖核酸に対する増幅率は、適当な緩衝液、dNTPおよび1または2以上のオリゴヌクレオチドのプライマーの存在下にTma DNAポリメラーゼを添加することによって合成することができる。適当な単一のプライマーを添加する場合、プライマー伸長生成物は一本鎖核酸に対して相対的であり、そして等しいか、あるいは等しくない長さ（プライマーが簡便にハイブリダイゼーションするかどうかに依存する）の鎖の二本鎖となって核酸鎖とハイブリダイゼーションし、次いでこれを前述したように一本鎖に分離して、2つの単一の、分離された、相対的な鎖を生産することができる。次いで

第2プライマーを添加し、こうしてプライマーの伸長の引き続くサイクルを鑄型としてとる一本鎖の核酸および第1プライマーの伸長生成物の両者を使用して実施する。あるいは、2またはそれ以上の適当なプライマー（これらの1つは他の伸長生成物を鑄型として使用して合成をプライミングするであろう）を一本鎖の核酸に添加し、そして反応を実施することができる。

二本鎖の増幅または一本鎖複合の第2サイクルの増幅の場合におけるように、核酸が2つの鎖を含有する場合、プライマーのハイブリダイゼーションの前に、核酸の鎖を分離しなくてはならない。この鎖の分離は、物理的、化学的または酵素的手段を包含する、任意の適当な変性法により達成することができる。核酸の鎖を分離する1つの好ましい物理的方法は、核酸を完全な(>99%)変性が起こるまで加熱することを包含する。典型的な加熱変性は、核酸の組成および大きさに依存して、一般に約数秒〜数分の範囲の時間の間、約80℃〜105℃の温度を用いる。好ましくは、有効な変性温度は数秒〜1分間について90℃〜100℃である。鎖の分離はまた、ヘリカーゼ(Helicases)として知られている酵素または酵素RccA（これらはヘリカーゼの活性を有しして riboATP の存在下に DNA を変性することが知られている）のクラスからの酵素により誘発することができる。ヘリカーゼにより核酸鎖を分離するために適当な反応条件は Kuhn Hoffmann-Berling, 1978, *CSH-Quantitative Biology*, 43: 63 に記載されており、そして RccA を使用する技術は Radding, 1982, *Annu. Rev. Genet.*, 16: 405-437 において概観されている。この変性は等しいか、あるいは等しくない長さの2つの分離された鎖を生成する。

二本鎖の核酸を熱により変性する場合、反応混合物を各プライマーの相補的鎖（鑄型）配列へのハイブリダイゼーションを促進す

る温度に冷却する。この温度は、試薬に依存して、通常約25℃〜65℃、好ましくは37℃〜60℃である。ハイブリダイゼーション温度は有効な時間、一般に数秒〜数分、好ましくは10秒〜1分の間維持される。実際には、温度は単に約95℃から37℃程度に低く低下させ、そしてハイブリダイゼーションはこの範囲内の温度において起こる。

核酸が一本鎖または二本鎖であるかどうかにかかわらず、サーモタガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) からの DNA ポリメラーゼを、変性の前にまたはその間に、あるいは温度がハイブリダイゼーションを促進する範囲に低下しつつあるとき、あるいはその範囲にあるとき、添加することができる。Tma ポリメラーゼの熱安定性は任意の時間における Tma ポリメラーゼの反応混合物への添加を可能とするが、混合物がストリンジエントのハイブリダイゼーション温度以下に冷却されない時点において、ポリメラーゼを反応混合物に添加することによって、非特異的増幅を実質的に阻止することができる。

ハイブリダイゼーション後、酵素の活性が促進されたまたは最適化される温度、すなわち、ハイブリダイズしたプライマーおよび鑄型からのプライマー伸長生成物の合成を促進するにあたり酵素の活性を増加するために十分な温度に、反応混合物を加熱するか、あるいは維持する。温度は、実際に、各核酸の鑄型に対して相補的である各プライマーの伸長生成物を合成するために十分であるが、その相補的鑄型からの各伸長生成物を変性するほど高くあってはならない（すなわち、温度は一般に約80℃〜90℃以下である）。

使用する1または2以上の核酸に依存して、この合成反応に有効な典型的な温度は一般に約40℃〜80℃、好ましくは50℃〜75℃の範囲である。サーモタガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) の DNA ポリメラーゼについて、温度はより好ましくは約65℃〜75℃の範囲である。この合成に要求される時間は、温度、核酸の長さ、酵素、お

りおよび核酸混合物の複雑さに依存して、約10秒〜数分またはそれ以上の範囲であることができる。伸長時間は、通常、約30秒〜数分である。核酸がより大きい場合、より長い時間が相補的鎖の合成に要求される。

新しく合成された鎖および相補的核酸鎖は、増幅法の次の工程において使用される二本鎖の分子を形成する。次の工程において、二本鎖の分子の鎖は加熱変性により分離され、この加熱変性はその分子を変性するために有効な温度および時間の間実施されるが、熱安定性酵素が完全にかつ不可逆的に変性または不活性化される温度ではなくかつそれほど時間は長くはならない。この鑄型の変性後、温度は、前述したように、前の工程から生成した相補的一本鎖の核酸（鑄型）へのプライマーのハイブリダイゼーションを促進するレベルに低下させる。

このハイブリダイゼーション工程後、あるいはハイブリダイゼーション工程と同時に、温度は、熱安定性酵素の活性を促進して、新しく合成された鎖およびもとの鎖の両者を鑄型として使用するプライマー伸長生成物の合成を可能とするために有効な温度に調節される。温度はやはり前述したように、伸長生成物をその鑄型から分離（変性）するほど高くあってはならない。ハイブリダイゼーションはこの工程において起こることができるので、変性後の冷却の前の工程は不必要である。このような場合において、同時の工程を使用して、好ましい温度範囲は50℃〜70℃である。

鎖の分離、ハイブリダイゼーション、および伸長生成物の合成の1サイクルに關係する加熱および冷却の工程を、所望の量の特定の核酸配列を生成するために必要な回数だけ反復することができる。唯一の制限は存在するプライマー、熱安定性酵素およびヌクレオシド三リン酸の量である。通常、15〜30サイクルが完了する。増幅さ

れた DNA の診断的検出について、サイクルの数は試料の性質および試料の中核的濃度に依存するであろう。例えば、増幅される試料が純粋である場合、より少ないサイクルが要求される。試料が核酸の複雑な混合物である場合、より多いサイクルが検出のために十分なシグナルを増幅するために要求されるであろう。一般の増幅および検出のために、この方法は約15回反復される。増幅を使用して、標識された配列特異的プローブで検出すべき配列を発生するとき、およびヒトゲノム DNA が増幅の標的であるとき、明確に検出可能なシグナルを生成するために、すなわち、バックグラウンドのノイズが検出を妨害しないようにするために十分に配列を増幅するためには、この方法を15〜30回反復する。

主要な試薬が使い尽くされず、そして酵素が変性されるかあるいは不可逆的に不活性化されないことを条件として、追加のヌクレオシド、プライマー、または熱安定性酵素は初期の添加後に不必要であるが、そのような場合において、追加のポリメラーゼまたは他の試薬を反応を続けるために添加しなくてはならないであろう。しかしながら、各工程におけるこのような物質の添加は反応に悪影響を及ぼさないであろう。適当な数のサイクルを完結して、所望の量の特定の核酸配列を生成した後、通常の方法で、例えば、EDTA、フェノール、SDS、または CHCl₃ を添加して酵素を不活性化するか、あるいは反応の成分を分離することによって、反応を停止させることができる。

増幅の方法は連続的に実施することができる。自動化された方法の1つの態様において、温度がある時間の間あるレベルでコントロールされるように、反応混合物を温度サイクルすることができる。この目的のための1つのこのような装置は、パーキン・エルマー・セツス・インスツルメンツ (Perkin-Elmer Cetus Instruments) に

より簡便されかつ市販されている、均等反応を取り扱うための自動化された口組である。この装置を利用して PCRを自動化するための追加のインストラクションは、この装置の購入するとお入手可能である。

Taa DNAポリメラーゼは、ポリメラーゼ連鎖反応による核酸配列の均等が有用である多岐な方法において非常に有用である。均等方法を米国特許第 4,800,159号に記載するように利用して、適当な発現ベクター中への導入のための特定の核酸配列をクローニングすることができる。このベクターを使用して、組み換え DNA技術の標準的方法により、適当な宿主生物体を形質転換して遺伝子生産物を生成することができる。このようなクローニングは、平素均等の結合を使用するベクターの中への直接の結合、または制限酵素を使用するプライマー内に含有された部位における切断を包含することができる。Taaポリメラーゼに均等な他の方法は、米国特許第 4,683,195号および米国特許第 4,683,202号並びに欧州特許公開第 229,701号；欧州特許公開第 237,362号；および欧州特許公開第 258,017号（これらの開示をここに引用によって加える）に記載されているものを包含する。さらに、本発明の装置は非対称の PCR（参照、Gyllenstein および Erlich, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 7652-7656、その開示をここに引用によって加える）；逆 PCR（Ochoaら, 1988, *Genetics*, 120: 621、その開示をここに引用によって加える）において；および DNAの配列決定（参照、Innisら, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 9438-9440、および McConlogueら, 1988, *Nuc. Acids Res.*, 16(20): 9889)のために有用である。Taaポリメラーゼはまた、逆転写酵素活性を有すると信じられる：PCT特許公開第 91/09944号、1991年7月11日公開を参照のこと、その開示をここに引用によって加える。

を提供する。結局、増加したcDNAの収量はまたこれらの方法から生ずる。

前述したように、Taa DNAポリメラーゼによる RNA転写の生成物は RNA/cDNAハイブリッドの分子である。この RNAを加齢性あるいはアルカリ、熱、または酵素処理を包含する任意の他の既知の方法により除去する。次いで残存するcDNA鎖は自己相対的鎖の重合のための均等として働き、これにより均等または他の取り扱いに適合二本鎖cDNA分子を提供する。第2鎖の合成は配列特異的プライマーおよび Taa DNAポリメラーゼを必要とする。

第2鎖cDNAの合成後、生ずる二本鎖cDNA分子は、DNA配列決定、PCRによる均等または特定の核酸配列の抽出を包含する、ある種の目的に役立つことができる。cDNAのセグメントの均等に有用な特定のプライマーを、逆転写後、追加することができる。また、第1鎖のプライマーを使用して特定のcDNAを合成し、そして第2の入れ子の鎖のプライマーを使用して所望のcDNAセグメントを均等することである。これらの反応のすべては Taa DNAポリメラーゼにより触媒される。

Taa DNAポリメラーゼはまた、試料中の RNA鎖の分子を抽出する方法を簡便化および改良するために使用できる。これらの方法において、Taa DNAポリメラーゼは次の反応を触媒する：(a) 逆転写；(b) 第2鎖cDNAの合成；および必要に応じて(c) PCRによる均等。単一の装置のみを必要とする改良に加えて、既述する方法における Taa DNAポリメラーゼの使用は、各手順の工程のために異なる装置の使用のために必要であった、2種のインキュベーション条件の従属の条件を排除する。Taa DNAポリメラーゼの使用は、RNAの転写および相対的 DNAの均等を均等された特異性をもって、従来の RNAのクローニングおよび抽出の方法より工程の数を少なくして

Taa DNAポリメラーゼの逆転写酵素活性は、RNAを転写および均等する方法におけるこの装置の使用を可能とする。このような方法の改良は単一の装置の使用にあるが、従来の方法はより多い装置を必要とした。

改良された方法は、工程：(a) RNA均等と適当なプライマーとを、プライマーが対応する RNA均等にアニーリングする条件下に組み合わせ；そして(b) アニーリングされたプライマー-RNA均等の混合物を Taa DNAポリメラーゼと、その DNAポリメラーゼがデオキシヌクレオシド三リン酸の重合を触媒して RNA均等の配列に対して相対的な DNA配列を形成するために十分な条件下に、インキュベーションすることによって、RNAを逆転写する、ことを含んでなる。

上記の方法の他の面において、RNA均等にアニーリングするプライマーはまた、PCRによる均等のために適当であることがある。

PCRにおいて、逆転写されたcDNA鎖に対して相対的である第2プライマーは伸長生成物の合成の開始部位を提供する。既に述べたように、Taa DNAポリメラーゼはcDNA均等上のこの伸長反応を触媒することができる。

Taa DNAポリメラーゼによる RNA分子の均等において、第1伸長反応は逆転写であり、ここで DNA鎖は RNA/cDNAハイブリッドの分子の形質で生成される。DNA鎖を均等として使用する第2伸長反応は、二本鎖 DNA分子を生成する。こうして、Taa DNAポリメラーゼを使用する RNA均等からの相対的 DNA鎖の合成は、PCRによる均等のための出発物質を提供する。

Taa DNAポリメラーゼを RNA均等からの核酸の転写に使用するとき、Hg²⁺を含有する緩衝液の使用は、従来の使用されたHg²⁺を含有する逆転写緩衝液と比較して、Taa逆転写酵素活性の改良された均等

を提供する。これらの方法は実験室および臨床的分析のためのキットにおける使用に適合可能である。

上の方法において転写されそして均等された RNAは、多岐の源に由来することができる。RNA均等は、任意の生物体からの細胞の抽出物、例えば、ウイルスまたはバクテリアの細胞の抽出物の中に含有されていることができる。この抽出物は細胞の破片および他の成分、溶菌された RNA、または抽出されたcRNAを含有することができる。RNA均等はまた試料中の不均一な RNA分子の集団であることができる。さらに、均等の RNAは生物学的試料の中に含有されることがあり、そして試料は RNAがほんの小さい部分である、均等の試料であることができる。このような生物学的試料の例は、血液の試料およびバイオプシーの組織試料を包含する。

上の方法の逆転写工程における使用するプライマーは RNA均等に対して一般に完全に相対的であるが、プライマーは完全に相対的である必要はない。PCRにおけるように、逆転写が均等するためにはプライマーのすべてが均等にアニーリングしなくてもよい。例えば、非相対的鎖はプライマーの5'末端に存在することができ、プライマーの4'末端は RNAに対して相対的である。あるいは、非相対的鎖がプライマーの中に介在することができるが、ただしプライマーの配列はハイブリダイゼーションが均等かつ相対的 DNA鎖の合成を可能とするために十分な RNA均等と相対性をもつことを条件とする。

以下の実施例は例示のみに提供され、そして特許請求される本発明の範囲をいかなる方法においても限定することを意図しない。これらの実施例において、特異しない限り、すべての百分率は重量について重量により、そして液体について容積により、そしてすべての温度は℃である。

実施例 1

サーモタガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) の DNAポリメラーゼの精製

この実施例は、サーモタガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) からの Tma DNAポリメラーゼの精製を記載する。DNAポリメラーゼは、Lawyerら、1989, J. Biol. Chem., 264 (11): 8427-8437 (その開示をここに引用によって加える) の中に Tag DNAポリメラーゼについて記載されている1つの変異 (1 mMのMgCl₂) を有する方法に従い精製の間に、種々の時点で測定した。

典型的には、この測定は25mMのTAPS-HCl, pH9.5 (20°C); 50mMのKCl; 1 mMのMgCl₂; 1 mMのβ-メルカプトエタノール; 20 μMの各々のdATP, dCTP, dGTPおよびTTP; 10mMのα-³²P-dCTP (0.03 ~ 0.07 μCi/μM); 12.5 μgの活性化サケ精子 DNA; 並びにポリメラーゼから構成された反応混合物の50 μlの合計体積で実施する。反応を、希釈物 (希釈物は10mMのトリス-HCl, pH8.0, 50mMのKCl, 0.1 mMのEDTA, 1 mg/mlのオートクレーブ処理したゼラチン、0.5%のNP40, 0.5%の Tween 20および1 mMのβ-メルカプトエタノールから構成されている) 中のポリメラーゼの添加により開始し、そして反応を75°Cにおいて実施する。下に示す計算のために、添加したポリメラーゼ (および希釈物) の体積を5 μlであり、そして合計反応体積を50 μlであると仮定する。10分間のインキュベーション後、10 μlの50mMのEDTAの添加により反応を停止させる。反応混合物を遠心し、そして50 μlの反応混合物を10mlの2 mMのEDTA中50 μg/mlのキャリアー DNA (0°C) に移す。等しい体積 (1 ml) の20%のTCA, 2%のピロリン酸ナトリウムを添加し、そして混合する。この混合物を0°Cにおいて15~20分間インキュベーションし、次いでワットマン (Whatman) GP/Cフィルターで濾過し、そして5

%のTCAおよび1%のピロリン酸ナトリウムを含有する混合物 (8 × 5 ml) でよく洗浄し、次いで冷95%のエタノールで洗浄する。次いでフィルターを乾燥し、そして放射能を計数する。バックグラウンド (背景なし) は通常インプット cpmの0.001%~0.01%である。約50~250ピコモルの³²P-dCTP標準を単位の計算のためにスポットティングする。1単位は75°Cにおいて30分間で組込まれた10nMのdNTPに等しい。単位は次のようにして計算する:

$$\frac{\text{試料のcpm-酵素希釈物のcpm}}{\text{dCTPの比活性(cpm/pmol)}} = \text{組込まれたdCTPのpmole}$$

$$\frac{\text{組込まれたpmole} \times 3 \times \text{希釈係数} \times 4}{4.167 \times 10} = \text{単位/ml}$$

4.167の係数は、停止液の添加後の反応体積 (80 μl) の5/8 (50 μl) のみを計数することから生ずる。

すべての操作は、特記しない限り、0°C~4°Cにおいて実施した。すべてのガラス器は使用前にベーキングし、そして精製に使用した溶液は、可能ならば、使用前にオートクレーブ処理した。

約50gの凍結したサーモタガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) 菌株MS88の細胞 (教授 H. O. Stetter博士、ドイツ国レゲンスバーク、により提供された) を、2.4mMのPNMP (DMP中144mMのストックから) を含有する25mlの3 × TE-DTT緩衝液 (150mMのトリス-HCl (pH7.5), 8 mMのEDTA, および3 mMのβ-チオスレイトール) の中で懸濁し、そして真空凍結機により急速に均質化した。懸濁した細胞をアミンコ (Amicon) フレンチ圧力セル (8~20,000psi) の中で溶解した。リゼイトを追加の2.4mMのPNMPを含有する1 × TE-DTT緩衝液で最終5.5 × 細胞乾重に希釈し、そして超音波処理して粘度を減少させた (40~100%のアウトプット、9分、50%の使用サイクル)。生ずる分画、分画 I (275ml) は5.31gのタンパク質および15.5 ×

10⁴ 単位の活性を含有した。硫酸アンモニウムを0.2M (7.25g) に添加し、そしてリゼイトを氷上で15分間攪拌した。硫酸アンモニウムはTma DNAポリメラーゼが粗製のリゼイトの中のDNAに結合するのを防止し、そしてDNAポリメラーゼと他の細胞リゼイトのタンパク質とのイオン性相互作用を減少する。

実験的試験は、0.2%のポリミン (Polymia) P (ポリエチレニミン, PEI) が全核酸の≥92%を沈殿させることを示した。ポリミン P (pH7.5) を0.2% (5.48mlの10%のPEI) にゆっくり添加し、そしてこのスラリーを氷上で30分間攪拌し、次いで30,000 × gで4°Cにおいて30分間遠心した。上澄み液を分画 II (246ml) と表示し、そして3.05gのタンパク質および12.5 × 10⁴ 単位の活性を含有した。

分画 II を3.24gの固体硫酸アンモニウムの添加により0.3M硫酸アンモニウムに調製し、DNAポリメラーゼのフェニルセファローズへの完全な結合を確保した。次いで分画 II を2.2 × 8.6cm (25ml) のフェニルセファローズCL-4B (ロット0M08012, Pharmacia-LKBから購入した) カラム (0.3Mの硫酸アンモニウムおよび0.5mMのDTTを含有するTEの中で平衡化したもの) 上に38ml/時 (10ml/cm²/時) で負荷した。すべての樹脂は製造業者のインストラクションに従い平衡化しそして再循環した。カラムを150mlの同一の緩衝液で洗浄し (基線に対してA₂₈₀)、次いで0.8mMのDTTを含有する (硫酸アンモニウムを含まない) 80mlのTEで洗浄し、次いで0.5mMのDTTを含有するTE中20%のエチレングリコール95mlで洗浄し、そして最後に20%のエチレングリコールおよび0.5mMのDTTを含有するTE中2Mの尿素で溶出した。カラムの分画を測定するとき、活性の大きい比率が流過分画および洗浄分画の中に見いだされ、カラムの容量を超えたことを示した。この最初のフェニルセファローズのカラムに結合したDNAポリメラーゼのほぼ70%は低い塩において溶出され

(TE-DTT洗浄液で)、そして結合した物質の残部は2MのTE-DTT洗浄液中20%のエチレングリコール中2Mの尿素で溶離された。

第1フェニルセファローズのカラムからの流過液の活性はPSII負荷と表示し (228ml)、そして1.78gのタンパク質を含有した。分画PSII負荷を第2フェニルセファローズカラム (同一のロットおよび寸法) に適用し、そして実験を同一の方法で反復した。再び、カラムの容量を超え、そして活性は低い塩および2Mの尿素の洗浄液の両方で溶出されることがわかった。結合したDNAポリメラーゼのわずかに10%がTE-DTT洗浄液で溶離された; 主要な部分 (約90%) はTE-DTT洗浄液中20%のエチレングリコール中2Mの尿素で溶出された。

第2フェニルセファローズカラムからの流過液の活性を第1および第2のフェニルセファローズのカラムからのTE-DTT溶出液と一緒にし、そして0.3Mの硫酸アンモニウムに調製した。この分画 (PSIII負荷、259.4ml) は831mgのタンパク質を含有し、そして50mlのベッド体積の第3フェニルセファローズカラムに10ml/cm²/時で適用した。この時、適用した活性のすべてはこのカラムにより保持され、そしてTE-DTT洗浄液中20%のエチレングリコール中の2Mの尿素でのみ溶出された。

3つのすべての尿素溶出液を別々にアミコン (Amicon) YN30上で約3~4倍に濃縮し、そして溶出後短時間でヘパリンセファローズ負荷緩衝液の中に透析して、尿素への延長された暴露を回避した (カルバミル化を回避するために)。透析しかつ濃縮した尿素溶出液をタンパク質濃度について測定し、そしてそれらの比活性が大きく変化的ことが発見された。第2フェニルセファローズカラムからの尿素溶出液は他の2つの溶出液に比べて、有意に高い比活性 (約100位/μgのタンパク質において約8 × 10⁴ 単位の活性) で

活性の大部分を含有したので、これをそれらと別に処理した。

透析しそして透析したフェニルセファロースII尿毒症抽出液を、0.08 Mの KCl, 50mMのトリス-Cl, pH7.5, 0.1mMのEDTA, 0.2%の Tween 20および 0.5mMの DTTにより平衡化した 5mlのベッド体積のヘパリンセファロースCL6B(Pharmacia-LKBから購入した) カラムに適用した。このカラムおよびすべての引き続くカラムを1ベッド体積/時で展開した。適用した DNAポリメラーゼ活性のすべてはこのカラムにより保持された。このカラムを17mlの同一緩衝液で洗脱し(最初にA₂₈₀)そして80mlの同一緩衝液中80~500mMの KClの直線勾配で洗脱した。

0.21~0.315Mの KClで洗脱する分画(0.53ml)をSDS-PAGEにより分析した。0.25~0.275Mの KClで洗脱するピーク分画を別々に集めた。前記の分画を後に他の分画と一緒にするために保持した。ピーク分画(アフィゲルI負荷)のプールを KClを含まないアフィゲルブルー緩衝液で希釈して、そのイオン強度を0.15Mの KClに減少した。

アフィゲルI負荷の分画は 3.4mgのタンパク質を含有しそして、25mlのトリス-Cl, pH7.5, 0.1MのEDTA, 0.2%の Tween 20, 0.5mlの DTTおよび0.15Mの KClの中で平衡化した 4.3mlのアフィゲルブルーカラム(BioRadから購入した)に適用した。適用した Tna DNAポリメラーゼのすべては保持された。このカラムを15mlの同一緩衝液で洗脱し、そして66mlの同一緩衝液中0.15~0.7Mの KClの直線勾配で洗脱した。

0.35~0.55Mの KClで洗脱する分画(0.58ml)をSDS-PAGEにより分析し、そして>80%の純度であるように認められた。ポリメラーゼのピーク分画は部位特異的エンドヌクレアーゼで汚染されていなかった(65℃において2単位位の Tnaポリメラーゼと 600ngのプラスミ

Mのリン酸カリウムで洗脱する分画(0.8ml)をSDS-PAGEにより分析した。アフィゲルカラムIの分画(これはSDS-PAGEにより約10~20%の純度であると認められた)と比較して、これらの分画は約5倍純度が低かった。0.105~0.255Mのリン酸カリウムで洗脱する DNAポリメラーゼのピーク分画を一緒にし、アミコンYH30膜上で5倍に濃縮し、そしてアフィゲルブルー緩衝液中で透析処理した。

アフィゲルII負荷分画を、アフィゲルブルー緩衝液中で平衡化した 3mlのベッド体積のアフィゲルブルーカラムに適用した。洗出可能な DNAポリメラーゼの活性は洗脱分画中に現れなかった。このカラムを9mlの同一緩衝液で洗脱し、そして50mlの同一緩衝液中の 0.2~0.7Mの KCl直線勾配で洗脱した。0.33~0.505Mの KClで洗脱する分画(0.58ml)をSDS-PAGEにより分析した。最初に洗出する分画はそれらの染色パターンによりわずかに一層きれいに見えたので、2つのプールをつくった。0.31~0.4Mの KClで洗脱する分画をプールIの中に一緒にした。0.4~0.515Mの KClで洗脱する分画をプールIIの中に一緒にした。2つのプールの各々を別々にアミコンYH30膜上で約7倍に濃縮した。

3つのすべてのアフィゲルブルーのプールはなお高いレベルの汚染非特異的ヌクレアーゼを含有した。70℃において 1.5単位位の DNAポリメラーゼと共にインキュベーションすることにより、一本組M13の DNA鎖およびプラスミドの多量片の制限消化物の両者は数時間以内に分解した。インシチュ活性ゲルを展開し、そして DNAポリメラーゼの分画がタンパク質的分画の分解を受けなかったことを示した。

第2アフィゲルブルーカラムからの2つのプールを一緒にし、そしてホスホセルロースカラム緩衝液中に透析した。透析した分画(P11 I負荷)を3mlのホスホセルロースカラム(25mMのトリス

FPLSGI(ccc-DNA)を使用し1または2時間インキュベーションした後、低分子量の特定の DNA断片の不存在により示された)。0.3~0.5Mで洗出するポリメラーゼのピークをプールし、そしてアミコンYH30膜上で約20倍に濃縮した。次いでこの分画を 2.5x 貯蔵緩衝液(50mMのトリス-Cl, pH7.5, 250mMの KCl, 0.25mMのEDTA, 2.5mMの DTTおよび 0.5%の Tween 20 (Pierce, Surface-Amps))中で透析処理し、そして4℃において貯蔵した。

第1および第3のフェニルセファロースのカラムからの尿毒症抽出液を、第1ヘパリンセファロースカラムからの前記分画と一緒にした。このプール(HSII負荷)は約 200mgのタンパク質を含有し、そして KClを含まないヘパリンセファロース緩衝液中80mMの KClにそのイオン強度を調整した。HSII負荷を16mlのベッド体積のヘパリンセファロースカラム(80mMの KCl, 50mMのトリス-Cl, pH7.5, 0.1mMのEDTA, 0.2%の Tween 20および 0.5mMの DTTの中で平衡化したもの)に適用した。洗出可能な活性は洗脱分画中に現れなかった。

このカラムを80mlの同一緩衝液で洗脱し、そして 200mlの同一緩衝液中80~750mMの KCl勾配で洗脱した。0.225~0.335Mの KClで洗脱する分画(2ml)を一緒にし、そしてアミコンYH30膜上で約5倍に濃縮し、そしてヒドロキシアパタイト緩衝液中に透析した。この分画(HA負荷)は 9.3mgのタンパク質を含有し、そして4mlのベッド体積のヒドロキシアパタイト(高い分画量の HPT, Calbiochemから購入した)カラム(10mMのリン酸カリウム緩衝液, pH7.5, 0.5mMの DTT, 0.1mMのEDTAおよび 0.2%の Tween 20の中で平衡化したもの)上に負荷した。

このカラムを12mlの同一緩衝液で洗脱し、そして60mlの10~500mMリン酸カリウム(pH7.5)の直線勾配で洗脱した。0.105~0.230

-Cl, pH7.5, 50mMの KCl, 0.1mMのEDTA, 0.2%の Tween 20および 0.5mMの DTTで一度洗浄したもの)上に負荷した。この洗浄は最初にホスホセルロース樹脂のpHの平衡化のために不十分であったことが証明された。不都合なことには、これは試料がカラム上に負荷された後に見出された。適用した活性のすべてはカラムに結合した。

このカラムを9mlの負荷緩衝液で洗脱し、そして45mlの50~700mMの KClの直線勾配で洗脱した。0.46~0.575mMの KClで洗脱する DNAポリメラーゼのピーク分画(0.58ml)をSDS-PAGEにより分析した。

汚染タンパク質の分画はピークを過ぎて回収された。約 45kDaの汚染バンドは0.53Mで洗脱する。約 85kDaの汚染バンドは0.54Mの KClにおける洗出ピークを有する。したがって、このカラムを反洗した(ポリメラーゼの洗出のプロファイルを監視して、多少高いイオン強度で負荷する)。第1ホスホセルロースのカラムから 0.475~0.58Mの KClで洗脱するピーク分画を第1アフィゲルカラムからのプールと一緒にした。一緒にした分画(P11 II負荷)は今や、回収されたポリメラーゼのすべて(約 7.5×10^4)を含有した。

分画P11 II負荷をホスホセルロース緩衝液で希釈して、イオン強度を 0.5Mの KClに調整した。P11 II負荷を9mlのベッド体積のホスホセルロースカラム(この場合、25mMのトリス-Cl, pH7.5, 200mMの KCl, 0.1mMのEDTA, 0.2%の Tween 20および 0.5mMのEDTA)の正しいpHおよびイオン強度に平衡化された)上に負荷した。このカラムを27mlの同一緩衝液で洗脱し、そして 140mlの 0.2~0.8Mの KClの直線勾配で洗脱することを意図した。しかしながら、0.8Mの KClの上限緩衝液の代わりに、緩衝液は52mMの KClの直線勾配を有し、これは極度の減少勾配を生じた。次いでこのカラムを32mlの 0.2Mの KCl-ホスホセルロース緩衝液により再び平衡化し、そして140

0.1の0.2 ~ 0.8Mの KClの勾配区を再び適用した。

洗脱液、洗脱液、および勾配分口の目的のアッセイにより、このより高いpH(pH7.5)において、DNAポリメラーゼはホスホセルロースに0.2Mの KClにおいて結合しないことが示された。洗脱液、洗脱液、および洗脱液の勾配区からの DNAポリメラーゼ活性を含む分画を一緒にした。生ずるプールをアミコンVH30以上で回収した。しかしながら、回収された分画は DNAポリメラーゼ活性のそれ以上の損失に導いた。回収された活性を50mMの KClのホスホセルロース担体液の中に透析し、そしてP11 III負荷と負荷した。

この分画を50mMの KClを含むホスホセルロース担体液により平衡化した50mlのベッド体積のホスホセルロースのカラム上に負荷した。適用した活性のすべてはこのカラムにより保持された。このカラムを15mlの同一担体液で洗脱し、そして50mlの同一担体液中の50~500mMの KClの勾配区で洗脱し、0.16~0.33Mの KClで洗脱する分画(0.87ol)をSDS-PAGEおよびイン-シチュ活性ゲルにより分析した。

染色パターンに基づいて、2つのプールを作った。0.215~0.31Mの KClで洗脱するピーク分画を、先行する分画および後の分画から割々に保持し、これらを一緒にして分画プールにした。両方のプールをセントリコン(centricon) 30以上で回収し、そして2.5×10⁶倍の濃縮液(50mMのトリス-CI, pH7.5, 250mMの KCl, 2.5mMの EDTA, 2.5mMの DTTおよび0.2%のツイーン20; Pierce, Surfact-Amps)中で透析処理し、引き続き1.5倍の80%のグリセロールと混合した。

約3.1×10⁶単位がピーク分画において回収され、両プールは追加の1×10⁶単位の活性をもたらす。精製された DNAポリメラーゼは、イン-シチュ活性ゲルの中の不変の移行パターンにより証明

されるように、分離しなかった。回収された DNAポリメラーゼのゲル電気泳動により決定された分子量はほぼ97kDaである。Taa DNAポリメラーゼは、Taq DNAポリメラーゼのアミノ酸残基588-587(DGTP1)および718-732(DGTP3)に相当する、エピトープの両方の抗体により認識される。

実施例2

Taa DNAポリメラーゼ1活性をコードする DNAの塩基

合成オリゴデオキシリボヌクレオチド DG184~ DG187は、高安定性 DNAポリメラーゼの塩基結合ドメイン(最も3'-側の14ヌクレオチド)におけるモチーフの1つに対する「前方」プライマーと表示される、4つの異なる16倍の塩基の(各々)22マーのプールである。このモチーフはアミノ酸配列 Gly-Tyr-Val-Glu-Thrであり、そしてサームス・アクアチクス(*T. aquaticus*)(Taq) DNAポリメラーゼのアミノ酸718-722に、およびサームス・サーモフィルス(*T. thermophilus*)(Tth) DNAポリメラーゼのアミノ酸720-724に同一に対応する。このモチーフはすべてのサームス(*Therous*)種における DNAポリメラーゼ遺伝子の中に見いだされる。一筋にしたプライマーのプールは64倍の塩基性であり、そしてプライマーはそれらの5'末端において BglII 認識部位をコードする。

前方プライマー DG184~ DG187を下に示す:

DG184 配列番号: 2 5' CGAGATCTCGNTAYGTGAAAC

DG185 配列番号: 3 5' CGAGATCTCGNTAYGTGACAC

DG186 配列番号: 4 5' CGAGATCTCGNTAYGTGAAAC

DG187 配列番号: 5 5' CGAGATCTCGNTAYGTGACAC

これらの前方プライマーにおいて: Aはアデニンであり; Cはシトシンであり; Gはグアニンであり; Tはチミンであり; YはC + T (pYrimidine)であり; SはG + C (Strong相互作用; 3 H-

結合)であり; WはA + T (Weak相互作用; 2 H-結合)であり; そしてNはA + C + G + T (aNy)である。

合成オリゴデオキシリボヌクレオチド DG180~ DG183は、高安定性 DNAポリメラーゼの塩基結合ドメイン(最も3'-側の14ヌクレオチド)におけるモチーフの1つに対する「逆」プライマーと表示される、4つの異なる8倍の塩基の(各々)20マーのプールである。これらのプライマーは相補的(+)の DNA配列に相補され、そしてモチーフ Gln-Val-His-Asp-Gluをコードし、そして Taq DNAポリメラーゼのアミノ酸782-786および Tth DNAポリメラーゼのアミノ酸784-788に同一に対応する。このモチーフはすべてのサームス(*Therous*)種における DNAポリメラーゼ遺伝子の中に見いだされる。一筋にしたプライマーのプールは32倍の塩基性であり、そしてプライマーはそれらの5'末端において EcoRI 認識部位をコードする。

逆プライマー DG180~ DG183を下に示す:

DG180 配列番号: 6 5' CGGAATTCRTCTGACCTG

DG181 配列番号: 7 5' CGGAATTCRTCTGACTTG

DG182 配列番号: 8 5' CGGAATTCRTCTGACCTG

DG183 配列番号: 9 5' CGGAATTCRTCTGACTTG

これらの逆プライマーにおいて、A, C, G, T, SおよびWは上に定義した通りであり、そしてRはG + A (purine)である。

Taa DNAポリメラーゼ遺伝子の約230bpの断片を増幅するために、H₂O₂を使用しないで80μlの中に次の成分を含むPCR増幅管を調製した: (1) 5ngの活性したTaaゲノムDNA; (2) 50ピコモル(合計)の1筋にした前方プライマーの塩 DG184-DG187; (3) 50ピコモル(合計)の1筋にした逆プライマーの塩 DG180-DG183; (4) 2単位のTaq DNAポリメラーゼ; (5) 50μM(最終)の各dNTP; (6) 0.05%のラウレス(Laureth)-12; および(7) 標準

的PCR増幅液、塩化マグネシウムを含まない。

試料を-70℃でフラッシュ凍結し、そして-20℃において貯蔵した。凍結した試料を20μlの10mMのMgCl₂(最終濃度2mM)で溶解し、直ちに50μlの反応をオーバーレイし、そしてパーキン・エルマー・セツス・サイクラー(Perkin Elmer Cetus Cycler)で次のファイルに従いサイクリングした: (1) 98℃への昇温-50秒の保持; (2) 50℃への冷却-10秒の保持; (3) 4分かけて75℃への傾斜; および(4) 98℃への上昇。このファイルを合計30サイクル反復した。増幅生成物の1/5(20μl)を3%のヌシエブ(Nusieve)/1%のシーケム(Sequen)アガロース凝縮ゲル上で増幅し、そしてほぼ230bpの断片を洗出し、回収し、そして BglII および EcoRI で消化した。

合成オリゴデオキシリボヌクレオチド DG154および DG155は、高安定性 DNAポリメラーゼのプライマー; 塩基結合ドメイン(最も3'-側の11ヌクレオチド)におけるモチーフの1つに対する「前方」プライマーと表示される2つの異なる32倍の塩基の(各々)19マーのプールである。このモチーフはテトラペプチドの配列 Thr-Ala-Thr-Glyであり、そして Taq DNAポリメラーゼのアミノ酸589-572および Tth DNAポリメラーゼのアミノ酸571-574に同一に対応する。このモチーフはすべてのサームス(*Therous*)種における DNAポリメラーゼ遺伝子の中に見いだされる。一筋にしたプライマーのプールは64倍の塩基性であり、そしてプライマーはそれらの5'末端において BglII 認識部位をコードする。

前方プライマー DG154および DG155を下に示す:

DG154 配列番号: 10 CGAGATCTACNGCAGCG

DG155 配列番号: 11 CGAGATCTACNGCAGCG

これらの前方プライマーにおいて、A, C, G, T, S, Wおよび

実施例3

サーモタガ・マリチマ(*Thermotoga maritima*)(Tma) DNAポリメラーゼI遺伝子のクローニング

この実施例は、サーモタガ・マリチマ(*Thermotoga maritima*)のTma DNAポリメラーゼI遺伝子(Tma PolI)をクローニングする試みおよび方法を記述する。

プライマー DG164-167および DG160-163(230bp) および DG154、155および DG160-163(667bp) により発現した PCR生成物の DNA配列は、XmaI制限部位の認識配列 5' CCCGGG を含有する。オリゴヌクレオチドを、XmaI部位の上流および下流の配列にハイブリダイゼーションするように設計した。DG224は21マーであり、XmaI部位に対して59-79bpだけ3'-末梢のPCR生成物に対して相同性である。DG225は22マーであり、XmaI部位からXmaI部位より21bp上流(5')までのPCR生成物に対して相同性である。DG224および DG225の配列を下に示す(KはGまたはTである)。

DG224 配列番号: 12 5' ACAGCAGCGKATATAATAAAG

DG225 配列番号: 13 5' GCCATGAGCTGCTATGCTCTC

DG224および DG225を、ほぼB. ピオチン-dUTP反応をオリゴヌクレオチドの3'末梢に付加するように設計した反応において、ピオチン-dUTPおよびトランスフェラーゼでテリングすることによって組み込んだ。これらの組み込んだオリゴヌクレオチドをゲノムのTma DNAの制限消化のサザンブロット分析においてプローブとして利用した。サザン分析の結果、および実施例2に記述するように生成したPCR生成物のDNA配列に基づいて、予想的制限地図を作成した。

予想的地図は、全体のTma DNAポリメラーゼI遺伝子が2つのXmaI制限断片を含有することを示した。5'末梢を包含する、遺伝子の大部分はほぼ2.6kbのXmaI断片上に位置する。この遺伝子の領域

びnは上に記述した通りである。

Tma DNAポリメラーゼI遺伝子のほぼ667bpの断片をクローニングするために、HgCl₂を併用しないで80μlの中に次の成分を含有するPCR増幅管を調製した: (1) 5ngの質性したTmaゲノムDNA; (2) 50ピコモル(合計)の1対にした両方プライマーの組 DG154-DG155; (3) 50ピコモル(合計)の1対にした逆プライマーの組 DG160-DG163; (4) 2μl位のTaq DNAポリメラーゼ; (5) 50μM(最終)の各dNTP; (6) 0.05%のラウレス(Laureth)-12; および (7) 反応のPCR緩衝液、塩化マグネシウムを含まない。

試料を-70℃でフラッシュ凍結し、そして-20℃において貯蔵した。反応した試料を20μlの10mMのHgCl₂(最終濃度2mM)で10分間、直ちに50mlの底油をオーバーレイし、そしてパーキン・エルマー・セツス・サイクラー(Perkin Elmer Cetus Cycler)で次のファイルに従いサイクリングした: (1) 98℃への段階-50秒の保持; (2) 50℃への段階-10秒の保持; (3) 4分かけて75℃への加熱; および(4) 98℃への上昇。このファイルを合計30サイクル反復した。

増殖生成物の1/5(20μl)を1.5%のアガロースゲル上で電気泳動し、そしてほぼ670bpの断片を抽出し、回収し、そしてBglIIおよびEcoRIで上のようにして消化した。

これらの増殖反応は、667bpの断片、および667bpの断片の下位断片である230bpの断片を生じた。これらの断片は、以下の実施例に記述するように、Tma DNAポリメラーゼI遺伝子のための完全なコード配列を得ると有用であることが証明された。

(および3'末梢)はほぼ4.2kbのXmaI断片上に位置する。全体のTma DNAポリメラーゼI遺伝子を含有する2つのXmaI断片を、製造するように、プラスミドpBS13+(また、pBSH13+と呼ぶ)の中にクローニングした。

約40μgのTmaゲノムDNAをXmaIで完全に消化した。XmaI消化物を電気泳動によりサイズ分画した。γ-³²P-ATP-キナーゼ処理したDG224およびDG225プローブを使用する、各分画の小部分のスロットブロット分析は、4.2kbの3'-断片(DG224とハイブリダイゼーション)および2.6kbの5'-断片(DG225とハイブリダイゼーション)を含有する分画を同定した。分画をエタノール沈殿により回収し、次いでXmaI消化したpBS13+(Stratagene)と混合した。アンピシリン耐性の形質転換体をニトロセルロースのフィルター上で固定し、そしてフィルターを適当ならばγ-³²P-ATP-キナーゼ処理したDG224およびDG225のプローブでブローディングした。プラスミドDNAをプローブとハイブリダイゼーションしたコロニーから回収した。制限分析を実施して、断片が期待したものであることを検証し、そしてpBS13+ベクターに因する断片の向きを決定した。クローニングした断片のDNA配列の分析を、「ユニバーサル」および「逆」配列決定プライマー(これらはベクター中で、制限部位のポリリンカー領域の外側でプライミングする)を用いて実施した。さらに、5'-クローニングについて、DG154-155/DG160-163の667bpのクローニングのDNA配列の決定に使用したプライマーを用いた。予想的DNA配列の分析により、Tma DNAポリメラーゼI遺伝子を含有する所望のDNA断片がクローニングされたことが検証された。

予想的DNA配列から、断片のより内部の領域のDNA配列を得るために、それ以上の配列決定プライマーを設計した。さらに、DNA配

列の分析を促進するために、2つのXmaI断片のいくつかの欠失を作った。2.6kbの5'-断片の両側の向きについて、EcoRI、SacI、およびXbaIの消化物の各々を欠失し、そして分子内の結合に好適な条件下に結合し、こうしてベクターEcoRI、SacI、およびXbaI部位とTma XmaI断片の対応する部位との間のDNAを欠失した。このような内部の欠失は、「ユニバーサル」または「逆」配列決定プライマーを使用する容易なDNA配列の分析を可能とする。

同様に、ベクターのBamHI部位を、そのクローニング中のTma PolIの内部のXmaI部位からほぼ850bpのBglII部位と融合して、4.2kbの3'-断片の欠失を作った(BamHIおよびBglIIは互いに容易に結合する同一のGATC結合末梢を有する)。この欠失はTma PolI遺伝子の3'末梢のDNA配列の分析を可能とする。

制限部位分析において、2.6kbの5'-断片および4.2kbの3'-断片の両方はNcoI、HdeIおよびAseI制限部位を欠失することが明らかにされる。Tma PolI遺伝子のATG開始およびコード配列を知ると、DNA配列をATG開始部位において逆読して、オリゴヌクレオチドの部位特異的突然変異によりNcoI、HdeIおよびAseI制限部位を含めるようなオリゴヌクレオチドを設計することができる。さらに、pBSH+ベクターのプロモーターとTma PolI遺伝子の開始部位との間の配列の欠失が、ATG開始部位におけるHdeIまたはAseI制限部位の包含と同時になされるように、突然変異のオリゴヌクレオチドを設計することができる。

ベクターの中のlacプロモーターとTma PolI遺伝子の開始部位との間の配列の欠失はまた、欠失された領域におけるXmaI制限部位を排除し、こうしてこの分野において適切な技術を使用する発現プラスミド中への全体コード配列のアセンブリングを促進する(例えば、同時電気泳動図455,967号,1989年12月22日提出、その開示を

ここに引用によって与える。の中の pDG174-pDG181についての合成のプロトコルを参照のこと。

図例 4

Taa DNAポリメラーゼを用いる PCR

約1.25位の図例 1 において得られた Taa DNAポリメラーゼを用いて、Tthゲノム DNAからのrRNA配列を調べる。反応体積は 50 μ l であり、そして反応混合物は 50 ピコモルのプライマー-DG73、 $10^5 \sim 10^6$ の Tthのコピー (約 2×10^5 コピーのゲノム/ngのDNA)、50 ピコモルのプライマー-DG74、200 μ Mの各dNTP、2 mMの $HgCl_2$ 、10 mMのトリス-HCl、pH 8.3、50 mMの KCl、および 100 μ g/mlのゼラチン (必要に応じて、ゼラチンを省略することができる) を含む。

反応はパーキナー・エルマー・セプス・インストルメンツ (Perkin-Blair Cetus Instruments) の DNAサーマルサイクラー (Thermal Cycler) で実施する。20~30サイクルの 96°C で 15 秒、50°C で 30 秒、および 75°C で 30 秒を実施する。20 サイクルにおいて、増殖生成物 (160 bp の大きさ) が臭化エチジウム染色したゲル上にかすかに見ることができ、そして 30 サイクルにおいて、生成物は臭化エチジウム染色したゲル上で容易に見ることができる (図外図下)。

より少ない量の Taa DNAポリメラーゼを使用する場合 (すなわち、0.31 単位/50 μ l の反応)、PCR はより少ない非特異的生成物を生ずるであろう。さらに、非イオン性洗剤、例えば、ラウレス-12 を反応混合物に約 0.5%~1% の最終濃度に加えると、PCR 生成物の収量を改良することができる。

プライマー-DG73 および DG74 を下に示す:

DG73 配列番号: 14 5' TACGTTCCCGGCCCTTGATC
DG74 配列番号: 15 5' AGGAGGTGATCCAACCGCA

図例 3 に記載するように、4.2 kb の 3' XbaI 断片を pBS+ 中にクローニングし、生ずるプラスミドを BamHI および BglII で消化し、そして消化からの大きい断片を結合することによって塩化して形成された。DG238 は EcoRV および BamHI 部位を TGA 停止コドンの直ぐ下に挿入する。変異コロニーの検出を [$\gamma^{32}P$] 標識したオリゴヌクレオチド DG239 で測定した。陽性のコロニーから早速したプラスミド DNA を適当な制限消化のパターンについてスクリーニングし、そして DNA 配列を印読した。得られた 1 つの正しいプラスミドを pTaa 3' out 1 として表示し、そして後に pTaa05 と改名した。

B. lac プロモーターのベクター中の全長 Taa 遺伝子のアセンブリ
大腸菌 (*E. coli*) 中の Taa PolI の低いレベルの発現および Taa PolI による大腸菌 (*E. coli*) ポリメラーゼ変異体の可能な類似性 (ここで高いレベルの発現は細胞を殺すことがあるが、低いレベルは検出または検出することができる) を研究する目的で、Taa PolI 遺伝子を pDS13+ クローニングベクターの中でアセンブリした。pTaa 3' out 1 からの約 300 bp の XbaI-EcoRV 断片を、アガロースゲルの電気泳動および臭化エチジウムの染色後、約 300 bp の断片を含むアガロースゲルのスライスを切取りそしてコスター (Costar) スピネックスのフィルターユニット中で転写することによって、転写および転写した。転写すると、このユニットをマイクロフーズ (microfuge) で回収し、そして DNA 断片を含む液体を回収した。エタノール沈殿後、断片を 2 つの 5' ベクター、pTaa5' Nde03 および pTaa5' Nde09 の各々と連結し、これらの各々を Asp718 で消化し、クローンおよびすべての dNTP で消化し (反応条件は次の通りである: 56 mM のトリス-HCl、pH 8.0、56 mM の NaCl、8 mM の $HgCl_2$ 、8 mM の DTT、5 μ M の dNTP および 11 単位のクローン、37°C、15 分; 次に 75°C において 10 分間不活性化する)、次いで XbaI でさらに消化

図例 5

Taa DNAポリメラーゼの遺伝子ベクター

A. Taa PolI 遺伝子の 5' および 3' 末端の変異

ベクター pBS: Taa7-1 (ATCC No. 68471、後で改名 pTaa01) 中の Taa 遺伝子の 5' 末端を、オリゴヌクレオチド DG240 および DG244 でオリゴヌクレオチドの部位特異的変異により変異誘発した。プラスミド pBS: Taa7-1 は、ベクター pBS+ の中にクローニングされた。2.6 kb の 5' XbaI 断片を含んで成る。同様の変異誘発から生ずる変異体は、pBS+ベクター中の β -ガラクトンダーゼの ATG と Taa PolI の ATG との間に欠失を有するので、Taa コード配列はベクター lac プロモーター、オペレーターおよびリボソーム結合部位 (RBS) を利用する発現のために位置された。両者の間の変異体はまた、Taa PolI のための第 2 および第 8 のコドン中に変異を有して、コードされたタンパク質のアミノ酸配列を変化させないで、大腸菌 (*E. coli*) のコドンの使用というそう適合性となった。さらに、DG240 は NdeI 制限部位をコード配列の ATG 開始部に位置した (5' CATATG)、そして DG244 は NcoI 制限部位をコード配列の ATG 開始部に位置させた (5' CCATGG)。DG240 変異の検出コロニーを [$\gamma^{32}P$] 標識したオリゴヌクレオチド DG241 でスクリーニングし、そして DG244 変異の検出コロニーを [$\gamma^{32}P$] 標識したオリゴヌクレオチド DG245 でスクリーニングした。プラスミド DNA を適当なプロンプとハイブリダイゼーションしたコロニーから回収し、そして変異は制限分析および DNA 配列の分析により証明された。DG240 の変異体を pTaa 5' Nde 8 と命名し、そして後に pTaa07 と改名された。

Taa PolI 遺伝子の 3' 末端を、pBS Taa 3' 11-18 Bam/Bgl (ATCC No. 68472、後で改名 pTaa04) 中で変異誘発オリゴヌクレオチド DG238 で変異誘発した。プラスミド pBS Taa 3' 11-18 Bam/Bgl は、

した。

図例 2 で実施した。XbaI 粘着末端を連結するために条件は次の通りであった: 20 μ g/ml の合計の DNA、20 mM のトリス-HCl、pH 7.4、50 mM の NaCl、10 mM の $HgCl_2$ 、40 mM の ATP、および 0.2 Weiss 単位の T4 DNA リガーゼ/20 μ l の反応、0°C、一夜。Asp718 消化しそしてクローンされた平末端断片を 8ccRV 消化した平末端断片と連結するために、第 1 の連結物を、同一の結合混合物の中で 4~5 倍に希釈しそして 15°C においてインキュベーションした。但し、10 mM の ATP および 10 Weiss 単位の T4 DNA リガーゼを 20 μ l の反応について使用した。連結物を DG101 宿主細胞に形質転換した。変異を適当な制限部位についてスクリーニングし、そしてクローニング部位付近の DNA 配列を印読した。所得のプラスミドを pTaa08 (ATG において NdeI 部位) および pTaa09 (ATG 部位において NcoI 部位) と表示した。

C. P. 発現ベクター中の全長 Taa 遺伝子のアセンブリ

A P. プロモーターのコントロール下に全長の Taa PolI をアセンブリしかつ発現するために使用した P. プロモーターの発現ベクターを下表に記述する。

ベクター	ATG 部位	RBS*	A ₂₅₅₁ +/-**	オリゴヌクレオチド二重鎖は pDG180 または pDG181 中にクローニング	Asp/Tot***
pDG174	NdeI	T7	-	DG108/DG107	Anp
pDG178	NdeI	N	-	DG110/DG111	Anp
pDG182	NcoI	T7	+	FL42/FL43	Amp
pDG184	NcoI	N	+	FL44/FL45	Anp
pDG185	NcoI	N	+	FL44/FL45	Tet

* PBS-ファージ T7 の遺伝子 10 またはラムダ遺伝子 N のリボソーム結合部位。

※ Aus11部位をCsp45Iで消化して回収し、クレーンで回収し、そして回収された空孔を回収したもの。

009 抗生物質耐性の決定はアンピシリンまたはテトラサイクリン。薬の中の5つのベクターは、アンピシリン耐性の場合、プラスミドpDG160の副産物であるか、あるいはテトラサイクリン耐性の場合、pDG181である。プラスミドpDG180およびpDG181並びに空に示す pDGベクターに類似するベクターを形成するスキームは、米特許出願第 455,967号、1989年12月22日提出（その開示をここに引用によって加える）に開示されている。ベクターはアンピシリンまたはテトラサイクリン耐性を与え、そしてすべてはサーモタガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) からのオートキシン耐性のレトロレギュレーターおよび同一の点突然変異を BNA11遺伝子の中に含有し、これらはプラスミドをコピー位について温度感受性とする。

空に開示されているプライマーおよびオリゴヌクレオチドを下に示す。

DG240	配列番号: 10	5' CCATCAAAAGAAATAGTCTAGCCATATGT GTTTCCTGTGTGAAATTTG
DG241	配列番号: 17	5' AAACACATATGGCTAGAC
DG244	配列番号: 18	5' CCATCAAAAGAAATAGTCTAGCCATGCTT GTTTCCTGTGTGAAATTTG
DG245	配列番号: 19	5' AAACAACCATGGCTAGAC
DG238	配列番号: 20	5' GCAAAACATGCTGCTGATATCGGATCCGGA GGTCTTATCTGTGG
DG239	配列番号: 21	5' CCGATATCACGACCATG
DG106	配列番号: 22	5' CCGGAAGAAGGAGATATACATATGAGCT
DG107	配列番号: 23	5' CATATGTATATCTCTCTCTT
DG110	配列番号: 24	5' CCGGAGGAGAAACATATGAGCT

DG111	配列番号: 25	5' CATATGTTTTCTCTCT
PL42	配列番号: 26	5' CCGGAAGAAGGAGAAATACCATGGGCCCGTAC CTAC
PL43	配列番号: 27	5' CCGGCCCATGGTATTTTCTCTCTCTT
PL44	配列番号: 28	5' CCGGAGGAGAAATCCATGGGCCCGGTAC
PL45	配列番号: 29	5' CCGGCCCATGGATTTTCTCTCT

8つの断片の融合を使用して、ベクター中でTna Pol1遺伝子をアセンブリングした。ベクターをSmaIおよびHdeI (pDG174, pDG178) またはNcoI (pDG182, pDG184, pDG185) で消化する。Tna Pol1遺伝子の5' 末端はNdeIおよびXbaIで消化した pTma5' Nde83 からのものであるか、あるいはNcoIおよびXbaIで消化した pTma5' NcoD9からのものである。遺伝子の3' 末端はXbaIおよびBcoRVで消化した pTma3' out11からのものでありそして約 300bpの断片を調製したように回収した。

表に示すプラスミドpDG182および上のスキームを使用して、発現ベクターpTma13を形成した。プラスミドpDG184および上のスキームを使用して、ベクターpTma12-1およびpTma2-3を形成した。プラスミドpTma12-3はpTma12-1と異なり、pTma12-3は同一の連結/形質転換のプロトコルの間に生成した pTma12-1の2合体である。プラスミドpDG185および上のスキームを使用して、発現ベクターpTma11を形成した。

ベクターはポリメラーゼ全コード配列を含有することができるが、この両端の短縮された形質転換的あるいは全長のプラスミドとの組み合わせで発現することができる。Tna DNAポリメラーゼのこれらの短縮された形質転換は、5' - ATG以外のコード配列中のメチオニン(ATC) コドンの1つにおいて起こる開訳開始から生ずる。モノマーのpTma12-1のプラスミドは、加齢弱弱すると、天然 Tna DNAポ

リメラーゼのアミノ酸 1-139を欠如する生物学的に活性な安定性 DNAポリメラーゼを主として生成する。約 86kDaのタンパク質は、Tnaコード配列の位置 140におけるメチオニンのコドンにおける開訳開始の結核であり、そしてHET140と呼ばれる。

適当な条件 (38℃ではなく、34℃または36℃における加齢弱弱) 下のHET140プラスミドの研究において、マルチマーのpTma12-3の発現ベクターは、有意なレベルの「金鼠の」 Tna DNAポリメラーゼ (SDS-PAGEによりほぼ 97kDa) およびより少量のHET140における開訳開始から生ずる短縮された (ほぼ 86kDa) の形質転換を生じた。全長の Tna DNAポリメラーゼのアミノ酸配列決定は、アミノ末端のメチオニンが除去され、そして第2位置の AlaがN-末端に存在することを示した。

短縮 Tna DNAポリメラーゼを、プラスミドpTma12-3を含有する大腸菌 (*E. coli*) 菌株 DG116から調製した。10リットルの発現用培養フラスコは、トリプトン (20g/l)、酵母エキス (10g/l)、NaCl (10g/l)、アンピシリン (100mg/l) およびチアミン (10mg/l) を含有した。培養フラスコに空天プレート (双糖グリセロール培養物を使用することもできる) からのコロニーを接種した。培養フラスコを30℃において 0.5~2.0光密度 (A₆₀₀) に増殖させた。発現槽の中に接種した培養物の体積を計算して、細胞の密度が 0.50gの乾燥細胞/lリットルであるようにする。12.5リットルの培養液は、60mMのKH₂PO₄、16mMのNaH₂PO₄、10mMのクエン酸および1mMのMgSO₄を含有した。次の成分の成分を添加した: 2g/lのグルコース、10mg/lのチアミン、2.5g/lのカザミノ酸、100mg/lのアンピシリン、および100mg/lのメチシリン。必要に応じて、増殖剤としてプロピレングリコールの添加により、細胞を抑制した。空気の流れを2リットル/分に制御した。発現槽

に前述したように接種し、そして培養物を30℃において 4.5時間0.7の細胞密度 (A₆₀₀) に成長させた。増殖温度を35℃にシフトして、短縮 Tna DNAポリメラーゼの合成を抑制した。温度のシフトはpTma12-3プラスミドのコピーの数を増加し、そして同時に宿主の中の欠陥のあるプロファージのリソゲンによりコードされる温度感受性シリプレッサーの不活性化により、感染された Tna DNAポリメラーゼ遺伝子のラムダP₂プロモーターがコントロールする転写を抑制させる。細胞を21時間の間4の光密度 (A₆₀₀) に増殖させ、そして遠心により回収した。生ずる細胞のペーストを-70℃で貯蔵した。

短縮 Tna DNAポリメラーゼを下の実験例6におけるように回収した。簡単に述べると、細胞を1体積のTB緩衝液 (50mMのトリス-HCl, pH7.5および10mMのEDTAおよび1mMのDTT) の中で洗浄し、そしてプロテアーゼ阻害剤を添加する (PHSPを2.4mMに、ロイペプチンを1μg/mlに、そしてTLCKを0.2mMに)。細胞をアミコ (Amico) フレンチ圧力セル中で 20,000psiにおいて溶解し、そして緩衝液を回収して粘度を低下させた。緩衝液を回収した細胞液およびプロテアーゼ阻害剤を 5.5×10⁶細胞の細胞液 (分画I) に添加し、0.3Mの硫酸アンモニウムに調整し、そして急速に75℃にし、そして75℃に15分間保持した。処理した上澄み液を0℃に急速に冷却し、そして大腸菌 (*E. coli*) 細胞の原および酸性化されたタンパク質を 20,000×gの30分間の遠心後に除去した。Tna DNAポリメラーゼ (分画II) を含有する上澄み液を凍らせて置く。凍結の>95%を沈降させるために必要なポリミン (Polymix) Pのレベルを試験法により決定する (濃度 0.6~1% w/vの範囲)。所定量のポリミン (Polymix) Pを0℃において30分間急速に攪拌しながらゆっくり添加し、そしてこの懸濁液を20,000×gで30分間遠心して、沈降した

細粒を除去する。Taa DNAポリメラーゼを含む上澄み液(分画III)を取って置く。

分画IIIを50mMのトリス-CI, pH7.5, 0.8Mの硫酸アンモニウム, 10mMのEDTAおよび1mMのDTTの中で平衡化したフェニルセファロースのカラムに適用する。カラムを2~4体積の同一緩衝液で洗出し(若くは対してA₂₈₀)、次いで1~2カラム体積の100mMのKClを含む1TE緩衝液で洗出して大部分の汚染するE. coliタンパク質を除去する。次いでTaa DNAポリメラーゼをカラムから50mMのトリス-CI, pH7.5, 2Mの尿素, 20% (w/v)のエチレングリコール, 10mMのEDTAおよび1mMのDTTを含む緩衝液で溶出し、そしてDNAポリメラーゼ活性を含む分画をプールする(分画IV)。

粗製Taa DNAポリメラーゼの最良の精製を、ヘパリンセファロースのクロマトグラフィー(天然またはHBT284粗製Taa DNAポリメラーゼについて)、アニオン交換クロマトグラフィー、またはアフィゲルブルーのクロマトグラフィーを使用して達成する。粗製Taa DNAポリメラーゼを2.5×体積緩衝液の中に透析し、1.5体積の緩衝液の80% (w/v)のグリセロールと一晩にし、そして-20℃において貯蔵する。

図表5

初産 TaaポリメラーゼHBT284の発現

上に記述したように、完全なTaa遺伝子のコード配列を含むする発現プラスミドは、開始コドンにおける翻訳の開始から生ずる全長のポリメラーゼ、あるいは位置140におけるメチオニンのコドンに存在する翻訳開始部から生ずる短縮されたポリメラーゼを発現した。翻訳開始部として作用することができる3'メチオニンコドンは、Taa遺伝子のコード配列の位置284に存在する。天然Taa DNAポリメラーゼのアミノ酸1-283を欠如するDNAポリメラーゼを発現する

プラスミドを、Taaのコード配列の対応する翻訳を欠如することによって生成した。

プラスミドpTaa12-1をBspHI(ヌクレオチド位置848)およびHindIII(ヌクレオチド位置2629)で消化した。1781bpの断片をアガロースゲル電気泳動により分離した。DNAからアガロースを分離するために、所望の断片を含むするゲルのスライスをコスター(Costar)スピンネックスフィルターユニットの中で-20℃において凍結した。室温において溶解後、ユニットをマイクロフーズ(microfuge)の中で回転した。DNAを含むするフィルターをスピード・バク(Speed Vac)真空装置で乾燥し、そしてDNAをエタノールで沈澱させた。

乾燥した断片をNcoIおよびHindIIIで消化したpTaa12-1の中にクローニングした。NcoIの消化物はBspHIによる消化物と同一の制限酵素の配列を有するので、1781塩基対の断片はNcoIおよびHindIIIで消化することによってプラスミドpTaa12-1から切除した全長の断片と同一の結合末端を有する。乾燥した断片と消化したプラスミドとの結合は断片のスイットを生じ、そしてpTaa14と表示するプラスミドをつくるために使用した。

プラスミドpTaa15は同一の乾燥した断片をpTaa13の中にクローニングすることによって生成した。pTaa14と同様に、pTaa15は天然Taa DNAポリメラーゼのアミノ酸1-283を欠如するポリメラーゼの発現を担う：図表は天然コード配列の位置284のメチオニンのコドンにおいて開始する。

pTaa14およびpTaa15の両者の発現プラスミドは、約70kDaの分子量の生物学的に活性な安定なDNAポリメラーゼを高いレベルで発現した；プラスミドpTaa15はT4DNAリガーゼより高いレベルでポリメラーゼを発現した。大腸菌(E. coli)PolIのクローン断片との類似性、例えば、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性のために必須

の3つのすべてのドメインにおけるアミノ酸配列のモチーフの保存性、アミノ酸からエキソヌクレアーゼ活性のために必須の第1ドメインまでの距離、および発現されたタンパク質の長さ、に基づいて、Taaポリメラーゼの短縮された形態(HBT284)は3'-5'エキソヌクレアーゼおよびブルーフリーディング(proof-reading)活性を有するが、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を欠如する。しかしながら3'-5'エキソヌクレアーゼ活性についての初期のSDS活性のゲルアッセイおよび溶液アッセイは、プラスミドpTaa15を収容する大腸菌(E. coli)宿主細胞により発現されたポリメラーゼのブルーフリーディング活性の有意の弱体化を示唆した。

HBT284Taa DNAポリメラーゼを、プラスミドpTaa15を含む大腸菌(E. coli)菌株DC118から回復した。10リットルの発酵の母液プラスコは、トリプトン(20g/l)、酵母エキス(10g/l)、グルコース(10g/l)、アンピシリン(50mg/l)およびチアミン(10mg/l)を含む。母液プラスコに琼脂プレート(琼脂、グリセロール培養物を使用することができる)からのコロニーを接種した。母液プラスコを30℃において0.5~2.0光学密度(A₅₅₀)に調整させた。発酵中に接種した母液培養物の体積を計量して、細胞密度が0.5g乾細胞/lリットルであるようにする。10リットルの培養物は、25mMのKH₂PO₄, 10mMのNaH₂PO₄, 4mMのクエン酸ナトリウム, 0.3mMのFeCl₃, 0.04mMのZnCl₂, 0.03mMのCoCl₂, 0.03mMのCuCl₂および1mMのH₂BO₃を含む。次の培養の成分を追加した：4mMのH₂SO₄, 20g/lのグルコース, 20mg/lのチアミン, および500mg/lのアンピシリン。pHをNaOHで8.8に調整し、そして発酵のpH, 0.8の増加によりコントロールした。グルコースをNH₄OHの添加と組み合わせて逐次的に添加した。必要に応じて、消泡剤としてプロピレングリコールの添加により、発酵を抑制した。

溶解した培養物の密度を40%に調整した。

発酵中に前述したように接種し、そして培養物を30℃において0.5~1.0×10⁶の細胞密度(15の光学密度(A₅₅₀))に調整させた。培養物を38℃にシフトして、HBT284のTaa DNAポリメラーゼの合成を誘導した。培養物のシフトはpTaa15のプラスミドのコピーの数を増加し、そして同時に宿主中の欠陥のあるプロファージのリソゲンによりコードされる温度感受性cIリプレッサーの不活性化により、感作されたTaa DNAポリメラーゼ遺伝子のラムダP₂プロモーターがコントロールする転写を誘導する。

細胞を8時間の間37℃(A₅₅₀)に調整させ、そして遠心により回収した。細胞塊(約95g/l)を50mMのトリス-CI, pH7.8, 20mMのEDTAおよび20% (w/v)のグリセロールを含む等しい体積の緩衝液の中に再懸濁させた。この懸濁液を液体窒素の中にゆっくり下して凍結液を「ピース」または小さいベレットとして凍結した。凍結した細胞を-70℃で貯蔵した。

200gの凍結したピース(100gの細胞と100gの緩衝液を含む)に、100mlの1×TE(50mMのトリス-CI, pH7.5, 10mMのEDTA)を追加し、そしてDTTを0.3mMに、PMSFを2.4mMに、ロイペプチンを1μg/mlに、そしてTLCK(プロテアーゼ阻害剤)を0.2mMに添加した。試料を氷上で溶解し、そして低速のブレンダーの中で均一に再懸濁した。細胞懸濁液を細胞をアミンコ(Aminco)フレンチ圧力セルの中で20,000psiにおいて溶解した。粘度を減少するために、溶解した細胞の試料を各3分間50%の使用サイクルおよび70%のアウトプットで4回超音波処理した。超音波処理物を1mMのDTT, 2.4mMのPMSF, 1μg/mlのロイペプチンおよび0.2mMのTLCK(分画I)を含むする1×TEで350mlに希釈した。細胞アンモニウムを0.3Mに調整した後、粗製のリゼイトを沈澱する水の中で急速に75℃にし、

そして75℃の水に15分間移して大腸菌 (*E. coli*) 宿主のタンパク質を酸性および不活性化した。抽出した試料を急速に0℃にし、そして氷上で20分間インキュベーションした。5℃において20,000×Gで遠心することによって沈出したタンパク質および細胞膜を除き、そして上澄み液 (分画II) を取って置いた。

抽出した上澄み液 (分画II) をポリエチレンジアミン (PEI) で処理して、DNAおよびRNAの除去した。ポリミン (Polymixin) P (34.98 mlの10% (w/v), pH7.5) を急速に攪拌しながら、437mlの分画IIに0℃において添加した。0℃において30分後、試料を20,000×Gで30分間遠心した。上澄み液 (分画III) を、50mMのトリス-Cl, pH7.5, 0.3Mの硫酸アンモニウム、10mMのEDTAおよび1mMのDTTの中で平準化した。100mlのフェニルセファロースのカラム (3.2×12.5cm) に、80ml/時で適用した。このカラムを約200mlの同一緩衝液で洗浄し (緩衝液に対してA₂₈₀)、次いで150mlの50mMのトリス-Cl, pH7.5, 100mMのEDTAおよび1mMのDTTで洗浄した。次いでHET284のTaa DNAポリメラーゼをカラムから50mMのトリス-Cl, pH7.5, 2Mの尿素、20% (w/v) のエチレングリコール、10mMのEDTAおよび1mMのDTTを含有する緩衝液で溶出し、そしてDNAポリメラーゼ活性を含有する分画をブールした (分画IV)。

分画IVを50mMのトリス-Cl, pH7.5, 1mMのEDTAおよび1mMのDTTの中で50mMのKClに苛しい苛電性に加し、この試料を、同一緩衝液の中で平準化した150mlのヘパリンセファロースのカラムに適用 (90ml/時) した。このカラムを同一緩衝液で約140ml/時 (3.5カラム体積) で洗浄し、そして同一緩衝液中の150mlの0.05~0.6MのKClで溶出した。DNAポリメラーゼ活性は0.11~0.22MのKClの面で溶出された。pTaa15でエンコードされたTaa DNAポリメラーゼを含有する分画をブールし、濃縮し、そして2.5×貯蔵緩衝

液 (50mMのトリス-Cl, pH8.0, 250mMのKCl, 0.25mMのEDTA, 2.5mMのDTTおよび0.5%の Tween 20) に対して透析濃縮し、91% 濃度で1.5体積の白口の80% (w/v) のグリセロールを混合し、そして-20℃において貯蔵した。必要に応じて、ヘパリンセファロース溶出のDNAポリメラーゼまたはフェニルセファロース溶出のDNAポリメラーゼを透析するか、あるいは50mMのトリス-Cl, pH7.5, 1mMのDTT, 1mMのEDTAおよび0.2%の Tween 20の中で50mMのKClに苛しい苛電性に加し、そして同一の緩衝液の中で平準化したアフィニティブルーカラムに適用 (10gのタンパク質/mlの樹脂) することができる。このカラムを3~5カラム体積の同一緩衝液で洗浄し、そして10カラム体積の同一緩衝液中のKClの勾配 (0.05~0.8M) で溶出した。DNAポリメラーゼ活性 (0.25~0.4MのKClの間で溶出する) を含有する分画をブールし、濃縮し、透析濃縮し、そして上のように貯蔵した。

図4のDNAポリメラーゼの相対的純度を比較した。97.5℃において、天然Taa DNAポリメラーゼの半減期は天然または合成 Taq DNA (すなわち、AmpliTaq[®]) ポリメラーゼの半減期の2倍より大きい。長くべきことには、HET284Taa DNAポリメラーゼの97.5℃における半減期は天然Taa DNAポリメラーゼの半減期より3倍長い。

10mMのトリス-Cl, pH8.3および1.5mMのMgCl₂ (Taqまたは天然Taa DNAポリメラーゼについて) または3mMのMgCl₂ (HET284Taa DNAポリメラーゼについて)、50mMのKCl (Taq、天然TaaおよびHET284Taa DNAポリメラーゼについて) またはKCl不含 (HET284Taa DNAポリメラーゼ)、0.5μMの各プライマー PCR01およびPCR02, 100ngのラムダ複製DNA, 200μMの各dNTP (dCTPを除く)、および4単位/μlの各酵素を含有するPCR管を97.5℃において大きい水浴中で0~60分間インキュベーションした。試料を短時間で抜き出し、0℃

において貯蔵し、そして5μlを残留活性についての標準の活性のアッセイにおいて75℃において10分間測定した。

Taq DNAポリメラーゼは97.5℃において約10分の半減期を有したが、天然Taa DNAポリメラーゼは97.5℃において約21~22分間の半減期を有した。長くべきことには、Taa DNAポリメラーゼのHET284の形態は、Taqまたは天然Taa DNAポリメラーゼのいずれより有意に長い半減期 (50~55分) を有した。HET284Taa DNAポリメラーゼの改良された純度は、PCRにおける、とくにG+Cに富んだ領域の増幅困難である場合に用途を見いだすであろう。なぜなら、量的およびPCR生成物の配列の完全な活性に要求される標準の温度は尿素の不活性化に苛くからである。

50μlの10mMのトリス-Cl, pH8.3, 3mMのMgCl₂, 20μMの各dNTP, 0.5ngのパクテリオフィージラムダのDNA, 0.5μMのプライマー PCR01, 4単位 HET284Taa DNAポリメラーゼおよび0.5mMのプライマー PCR02またはPL10を含有するPCR管を、1分間の98℃のT (変性) および2分間の60℃のT (アニーリング-伸長) を使用して25サイクルをサイクルした。ラムダ DNA複製、デオキシタクトレオチドのストック溶液、並びにプライマー PCR01およびPCR02は、PECI Gene Amp[®] キットの一部分であった。プライマー-PL10は配列: (配列番号: 45) 5'-GGCGTACCTTTGTCTCAGGGCAAC-3' を有し、そしてパクテリオフィージラムダのタクトレオチド 8108-8130に対して相補的である。

プライマー PCR01およびPCR02は、ラムダからの500bpの生成物を増幅する。プライマー-PCR01およびPL10はラムダからの1kbの生成物を増幅する。それぞれのプライマーの組を使用して増幅した後、5μlのアリコートを手アガロースゲルの電気泳動にかけ、そして一定の位置する生成物のバンドを真化エチジウムの染色で可視化

した。0.5ngレベルの生成物が両者のプライマーの組で発生し、HET284Taa DNAポリメラーゼは正確な配列を容易に増幅したことを示す。

実施例7

切取Taaポリメラーゼの出現

上に記述したように、完全なTaa DNAポリメラーゼ遺伝子のコード配列を含有するプラスミドで形質転換された宿主細胞は、短縮された形態 (HET140) のTaaポリメラーゼを分泌または全長のポリメラーゼと一緒に出現する。疫見を行って、出現されるポリメラーゼの形態をコントロールすることができる。ポリメラーゼのHET140の強制的な出現を抑制するために、139までのアミノ酸に相当するコード領域を発見ベクターから欠失した。このようなに欠失を形成するプロトコルは実施例6に記述されている形成に類似する: 短縮された遺伝子断片を切り出し、次いで全長の断片が切除されているベクターの中に入力する。しかしながら、短縮された断片は、制限消化物から出現するよりむしろPCR増幅生成物として得られる。この方法は有用な場合に所しい上流制限部位 (または他の配列) の増幅を可能とする。

位置140におけるメチオニンのコドンまでの領域を欠失するため、SphI部位をpTaa12-1およびpTaa13中にPCRを使用して導入した。位置140のメチオニンのコドンのちょうど上流にSphI部位を導入するように、前方プライマー (FL83) を設計した。位置624にXbaIを含むように、逆プライマー (PL89) を選択した。SmaIで線状化したプラスミドpTaa12-1をPCR断片として使用して、225bpのPCR生成物を生成した。

消化の前に、PCR生成物をPCR反応混合物中の50μg/mlのプロテイナーゼK + 0.5%のSDSおよび5mMのEDTAで処理した。37℃に

において30分回インキュベーションした後、プロテイナーゼKを68℃で10分回加温不活性化させた。この手口は、引合く制限消化を阻害しうる生成物に適合した Taqポリメラーゼを併用した。制限消化をTE緩衝液に交換し、そして過剰の PCRプライマーをセントリコン (Centricon)100マイクロコンセンレーターで除去した。

均質された断片をSphIで消化し、次いでクレノーで過剰して、SphI切断した反応に平滑末端をつくり、そして最終にXbaIで消化した。生ずる断片を、NcoIで消化したプラスミドpTaa13 (pTaa12-1が相当であったであろう) と融合し、クレノーで過剰し、次いでXbaIで消化した。この過剰は、最初のNcoI部位 (コード配列の第1メチオニンから上流) と導入されたSphI部位 (位置 140におけるメチオニンコード配列から上流) との間の領域が除去されたインフレームのコード配列を生じた。生ずる発現ベクターをpTaa16と表示した。

この実験例において使用したプライマーを下および配列のリストの順に記述する。

プライマー	配列番号	配列
FL63	配列番号: 30	5' GATAAAGGCATGCTTCAGCTTGTGAACG
FL69	配列番号: 31	5' TGTACTTCTCTAGAAGCTGAACAGCAG

実験例 8

HEP140発現ベクター中の望ましくない RBSの排除

Taa DNAポリメラーゼのHEP140の形成の少ない発現は、位置 140のメチオニンのコドンから上流のリボソーム結合部位 (RBS) を排除することによって達成することができる。オリゴヌクレオチド断片特異的変異誘発により排除した。過剰コードの冗長性の利点を利用して、コドンの第3位置を変化して読取配列を変更し、これにより、コードされたタンパク質のアミノ酸配列を変化しないで、RBSを排除することができる。

この実験例において使用したオリゴヌクレオチド配列を下記および配列番号の順に記述する。

オリゴ	配列NO.	配列
FL64	配列番号: 32	5' CTGAAGCATGCTTTGTCACCGTTACTAT GAATAT
FL65	配列番号: 32	5' TAGTAACCGGTGACAAAG

実験例 9

初期 Taa DNAポリメラーゼ HEP ASP21の発現

Taa DNAポリメラーゼ遺伝子のコード配列の位置21におけるアスパラギン酸のコドン付置において問題を開始するために、このコドンの前にメチオニンのコドンを導入し、そして最初のNcoI部位からこの導入されたメチオニンのコドンまでの領域を欠失させる。欠失の方法は、前述の同一の下流プライマー (FL69)、および 570bpの生成物を生ずるためにNcoI部位およびメチオニンのコドン間込むように設計した上流プライマー (FL68) を使用する手順を包含する。

均質された生成物をセントリコン (Centricon) -100マイクロコンセンレーターで口知して、過剰のプライマーおよび緩衝液を排除した。生成物をスピード・バク (Speed Vac) 口知器で口知し、次いで消化混合物の中に再懸濁させる。均質した生成物をNcoIおよびXbaIで消化する。同時に、pTaa12-1、pTaa13またはpTaa18-RBSを同じ2つの制限酵素で消化し、そして均質断片の消化物と消化した発現ベクターとを過剰した。生ずる組成物は、天然 Taaコード配列の開始コドンから上流のNcoI部位から、天然 Taaコード配列の位置21のアスパラギン酸のコドンから上流に導入された新しいメチオニンのコドンまでの欠失を有する。

同時に、四次の開始が天然 Taaコード配列の位置74のグルタミンのコドン Glu74において開始するように、欠失の区間体をつくるこ

とすることができる。メチオニンのコドンおよびNcoI部位を Glu74の前に導入するように上流プライマー (FL67) を設計する。使用する下流プライマーおよびクロニングのプロトコルは、HEP ASP21組成体について前述した通りである。

この実験例において使用した上流プライマーの配列を下記および配列番号の順に記述する。

オリゴ	配列番号	配列
FL66	配列番号: 34	5' CTATGCCATGGATAGATCGCTTCTACTTCC
FL67	配列番号: 35	5' CAAAGCCATGGAACTTACAAGGCTCAAGA

実験例 10

T7プロモーターをもつ発現ベクター

発現の効率化は、発現ベクター中のプロモーターおよびまたはリボソーム結合部位 (RBS) を変化するこによって達成することができる。T7 遺伝子10のプロモーターおよび RBSを使用して、発現ベクターpTaa17からの Taa DNAポリメラーゼの発現を促進し、そしてT7 遺伝子10のプロモーターおよび遺伝子Nの RBSを併用して、発現ベクターpTaa18からの Taa DNAポリメラーゼの発現を促進した。これらのベクターの組成は、pTaa12-1中に存在するユニーク制限部位: プロモーターから上流の AflII部位、RBSから下流のNcoI部位、およびプライマーと RBSとの間の BspEI部位を利用した。存在するプロモーターを、前の実験例に記述する技術に類似する技術を使用して、pTaa12-1から削除しそして合成T7 遺伝子10プロモーターと置換した。

2つのオーバーラッピングする合成オリゴヌクレオチドから合成インサートをつくった。pTaa7(T7 遺伝子10の RBSをもつ) をつくるために、互いに互いの PR414および PR416を混合し、加温口知させ、そして互いにゆっくり冷却した。ハイブリダイゼーションした

オリゴヌクレオチドをクレノーで伸長して、全長の二本鎖のインサートをつくった。次いで伸長した断片を *Afl*IIIおよび*Nco*Iで消化し、正確な「結合」 末端を形成した。インサートを *Afl*IIIおよび*Nco*Iで消化したプラスミド pTaa12-1 中にクローニングした。DG118 宿主細胞を生ずるプラスミドにより形質転換し、そして形質転換体を所望のプラスミドについてスクリーニングした。

同一手順を pTaa18 (遺伝子 N の RBS をもつ) の作図において使用したが、ただし FR414 および FR418 を使用し、そして伸長した断片を *Afl*III および *Bsp*EI で消化した。この DNA 断片を、*Afl*III および *Bsp*EI で消化したプラスミド pTaa12-1 中の P₁ プロモーターと置換した。

プラスミド pTaa17 および pTaa18 を使用して、阻発可能な T7 DNA ポリメラーゼ遺伝子を含有するように構築された大腸菌 (*E. coli*) 宿主細胞を形質転換する。

これらのベクターの形成において使用したオリゴヌクレオチドを下記および配列表の順に配列する。

FR414 配列番号: 36 5' TCAGCTTAAGACTTCGAAATTAATACGACTCA
CTATAGCGAGACCAACGGTTCCCTC
FR416 配列番号: 37 5' TCGACCATGGGTATATCTCTTCTTAAAGTTA
AACAAATTAATTTCTAGAGGGAACCGCTTG
FR418 配列番号: 38 5' TCAGTCCGCGATAAACAATTAATTTCTAGAGG
GAACCGCTTG

実施例 11

阻発カッピング

前述したように、タンパク質のためのコード配列の開始部位のちょうど上流に短いコード配列をカッピングすることによって、阻発カッピングはタンパク質の発現の効率を増加することができる。

2つの増幅された生成物をアニーリングしそして伸長することができるようにプライマー PL51 および PL49 を設計した。2つの増幅生成物を混合し、95℃に加熱し、室温にゆっくり冷却し、そして Taq ポリメラーゼで伸長した。

伸長されたインサートをプライマー PL48 および PL53 で増幅し、次いで *Xba*I および *Hra*I で消化した。プラスミド pTaa12-1 を *Hra*I で消化し、そして併用シロアルカリ性ホスファターゼで処理して再結合を防止した。消化した pTaa12-1 をインサートと連結した。生ずる形成体で DG118 宿主細胞を形質転換し、そして形質転換体を所望のプラスミド DNA についてスクリーニングした。生ずるベクターを pTaa20 と表示した。

オリゴヌクレオチドプライマーおよび T7 遺伝子 10-大腸菌 (*E. coli*) TrpE/TrpD 融合生成物 (遺伝子 10 のインサート) の配列を下記および配列表の順に配列する。

プライマー	配列番号:	配列
PL48	配列番号: 39	5' TCCGGACTTTAAGAAGGAGATATAC
PL49	配列番号: 40	5' AATAGTCTAGCCATCAGAAAGTCTCC TGTGC
PL51	配列番号: 41	5' AGACTTTCTGATGGCTAGACTATTTT TT
PL53	配列番号: 42	5' CTGAATCAGGAGACCCGGGCTCTTTC GTC

遺伝子 10 のインサート
5' CTTTAAGAAGGAGATATACATATCGCTAGCATGACTGGTG
GACAGCAAAATGCATGCACAGGACACTTTCTCATG

上流のコード配列の翻訳の停止は、下流のコード配列のための開始部位に空位に連結してリボソームの阻す。上流のコード配列は、所望のタンパク質のためのコード配列の開始に對して下流にリボソームを阻す阻発のみをする。

阻発的にカッピングした Taa の発現ベクターを形成し、そしてこの発現ベクターは Taa コード領域の上流に位置する大腸菌 (*E. coli*) の TrpE の最後の 6 コドンに對してインフレームで融合した T7 バクテリオファージの主要キャプシドタンパク質 (遺伝子 10) の最初の 10 コドンおよび阻発開始シグナルを有した。TrpE のための TGA (停止) コドンと Taa 遺伝子のための ATG (開始) コドンとを「カッピング」して、配列 TCATG を形成する。短いコード配列の翻訳と Taa コード配列の翻訳との間に、1 塩基のフレームシフトが要求される。

下記の実施例において、T7 遺伝子 10-大腸菌 (*E. coli*) TrpE/TrpD 融合生成物を含有する断片 (TrpE からの最後の 6 コドンおよび TGA 停止コドンならびに TrpD からのオーバーラップする ATG 開始コドン) は、前記で存在するプラスミドから転移された。当該断片は阻発するように、阻発的にカッピングした発現ベクターの形成において使用した T7 遺伝子 10-大腸菌 (*E. coli*) TrpE/TrpD 融合生成物は合成オリゴヌクレオチドとして形成することができる。加入された断片のための配列を下記および配列表の順に配列する。

T7 遺伝子 10-大腸菌 (*E. coli*) TrpE/TrpD 融合生成物を、プラスミド pSYC1869 からプライマー PL48 および PL49 を使用して増幅した。プライマー PL51 および PL53 では、pTaa08 (*Hde*I 部位を含有する全長クローン) 中の Taa-PolI 遺伝子の 5' 末端を、ATG 開始コドンから ATG 開始コドンの下流の *Hra*I 部位まで増幅した。オーバーラッピング領域を形成し、こうして本質的に実施例 10 に配列するようにし

実施例 12

ArgU tRNA の発現

コドンの使用のパターンは、サーモタガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) と大腸菌 (*E. coli*) との間で異なる。Taa コード配列において、アルギニンは「AGA」コドンにより最も頻りにコードされるが、このコドンは大腸菌 (*E. coli*) 宿主細胞の中で低い頻度で使われる。対応する「ArgU」tRNA は大腸菌 (*E. coli*) において低い口数で見られる。宿主細胞中の ArgU tRNA の低い口数は Taa ポリメラーゼ遺伝子の阻発効率を制限することがある。大腸菌 (*E. coli*) 宿主内の Taa コード配列の阻発効率は、「ArgU」tRNA のための遺伝子を含有する阻発ベクターを使用して、tRNA 遺伝子の多量のコピーを宿主細胞中にクローニングすることによって、この tRNA の口数を増加することにより改良することができる。

ArgU tRNA 遺伝子を、プライマー DG248 および DG285 を使用して、大腸菌 (*E. coli*) ゲノム DNA から PCR 増幅した。増幅生成物を *Sal*I および *Bsp*HI で消化し、そして次に ArgU 断片を消化したベクターと連結した。DG101 細胞を形質転換し、そして増幅したベクターを pARGO1 と表示した。最後に、DG118 宿主細胞を pARGO1 および pTaa12-1 により同時形質転換した。

この実施例において使用したオリゴヌクレオチドのプライマーを下記および配列表の順に配列する。

プライマー	配列番号:	配列
DG248	配列番号: 43	5' CCGGATCCAAAAGCCATTGACTCAG CAAGG
DG285	配列番号: 44	5' GGGGTCGACGCATCGCAGCAAAATA GACG

報 聖 訓 錄

[illegible]

Unclassified Application No.		
Is Documentation Considered To Be Relevant?	Documented From The Record Index?	
Category *	Description of Document, with title(s), where appropriate, of the volume number	
	Excluded or Other Info.	
Y	The Journal of Biological Chemistry, volume 264, no. 11, 15 April 1989, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. (Baltimore, US) F.C. Luyser et al.: "Isolation, characterization, and expression in Escherichia coli of the DNA polymerase gene from thermus aquaticus", pages 6427-6437, see page 6427, left-hand column, line 1 - right-hand column, line 15	12,13, 16-24
Y	EP_A_0359006 (TOYO BOSEKI KAGUSHIKI KAISHA) 21 March 1990, see page 2, line 42 - page 2, line 7	12,13, 16-24

國 原 調 査 報 告

US 9105753
SA 91035

This notice lists the names family members residing in the same Germany that in the above-mentioned jurisdiction search report. The members are an resident in the European Federal Office (EFO) file no 62/12/91. The European Federal Office is in no way liable for those jurisdictions which are merely given for the purpose of information.

Patent document used in priority request	Publication date	Patent family number(s)	Publication date
WO-A- 9109944	11-07-91	WO-A- 9109950	11-07-91
EP-A- 0359006	21-01-90	JP-A- 2060585	01-02-90

For more details about this story, see Official Account of the European Patent Office, No. 12/83

フロントページの続き

(51) Int. Cl. *	識別記号	庁内整理番号	F I
(C 1 2 N 9/12			
C 1 2 R 1:19)			
(C 1 2 N 1/21			
C 1 2 R 1:19)			
(C 1 2 N 15/54			
C 1 2 R 1:01)			

(72) 発明者 ストッフエル, スザンヌ
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94530,
 エル セリット, ガルビン ドライブ
 935